

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-503622

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)4月20日

(51) Int. Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 P 21/08		9161-4B	
C 0 7 K 16/00		8318-4H	
16/18		8318-4H	
16/32		8318-4H	
		9050-4B	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-514437  
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)12月10日  
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)8月11日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US93/12039  
 (87) 国際公開番号 WO94/13806  
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)6月23日  
 (31) 優先権主張番号 990, 263  
 (32) 優先日 1992年12月11日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

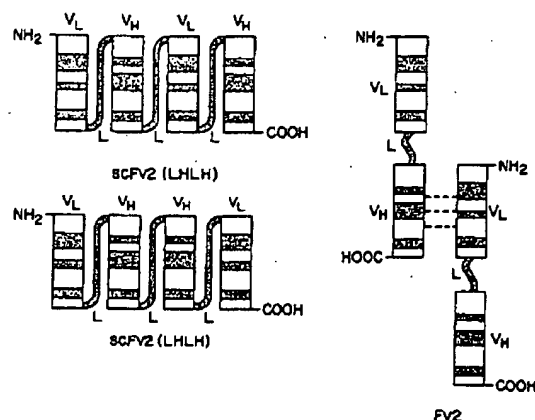
(71) 出願人 ザ ダウ ケミカル カンパニー  
 アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, アボット ロード, ダウ センター 2030  
 (72) 発明者 メゼス, ビーター エス.  
 アメリカ合衆国, コネチカット 06371, オールドライム, シル レーン 25  
 (72) 発明者 ゴーリー, ブライアン ビー.  
 アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, オーチャード ドライブ 3713  
 (74) 代理人 弁理士 石田 敦 (外3名)

(54) 【発明の名称】 多価の一本鎖抗体

## (57) 【要約】

本発明は、2以上の生物学的に活性な抗原結合部位を有する多価の一本鎖抗体を開示する。この多価の一本鎖抗体は、2本以上の一本鎖抗体を共有結合させるペプチドリンカーを用いることによって作った。各一本鎖抗体は、ペプチドリンカーにより、可変重鎖ドメインに連結されている可変軽鎖ドメインを有する。

共有及び非共有結合型一本鎖Fv多量体の図解



## 特許(内容に変更なし)

## 請求の範囲

1. 2以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは:

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと

連結せしめる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、多価の一本鎖抗体。

2. この第一のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys  
Asp Lys

を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

3. この軽鎖可変領域が、図3に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有しており、そしてこの重鎖可変領域が、図5に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有している、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

4. この第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

5. 多価の一本鎖抗体をコードするDNA配列であって、この多価の一本鎖抗体が2以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは:

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;

- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び

- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、DNA配列。

6. この第一のポリペプチドをコードする配列が図2のそれと実質的に同じであり、そして第二のポリペプチドをコードする配列が図3のそれと実質的に同じである、請求項5記載のDNA配列。

## 特許(内容に変更なし)

## 明細書

## 多価の一本鎖抗体

本発明は一本鎖の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質に反応して免疫系により誘発されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は四量体、又はその複合体であり、軽鎖と重鎖とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽鎖は一本の可変(V)ドメインと一本の定常(C)ドメインとより成り、他方、重鎖は一本の可変性ドメインと、3本以上の定常ドメインとより成る。軽鎖及び重鎖の両者に由来する、それぞれV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>と称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特異性を決定し、他方、定常(C)ドメインは様々なエフェクター機能をもたらす。

アミノ酸配列データは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保存されたフレームワーク領域(PR)によりフラックされている3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成ることを示唆する。このPRは可変領域ドメインの構造保全性を維持するものと考えられている。このCDRは個々の抗体の結合特異性にとって重要であり、且つ抗体の結合の多価性の原因であると推定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、IgGクラスは2つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五量体IgMクラスは10の同一の結合部位を有している。

同一の遺伝系列及び結合特異性を有するモノクローナル抗体は珍

断及び治療剤の両方として有用とされている。モノクローナル抗体は、確立された手順に従い、マウスのリンパ球と適当なマウスミエローマ細胞系との融合により作られたハイブリドーマにより日常的に産出される。しかしながら、ヒトにおけるインビボ治療及び診断に於けるネズミ抗体の投与は、ヒト免疫系により誘発されるヒト抗-マウス抗体応答に基づき制約されている。

キメラ抗体であって、一の種に由来する抗体の結合又は可変領域が別の種に由来する抗体の定常領域と組合せられたものが組換えDNA方法論により作られている。例えば、Sahagenら、J. Immunol., 137: 1066-1074 (1986); Sunら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214-218 (1987); Nishimuraら、Cancer Res., 47: 999-1005 (1987); 及び Lieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3439-3443 (1987)を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を開示している。典型的には、ネズミ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはネズミ抗体よりも免疫原性が実質的に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その高親和力学的に影響を及ぼすタンパク質構造全体のうちの主要部分を構成するFc領域を保有し続けている。免疫療法又は免疫診断における抗体の利用のため、鎖的組織に迅速に集中し、且つ結合する抗体分子を得ること、及び未結合の物質が身体から迅速に排除されることが所望される。一般に、小さめの抗体フラグメントは高めの毛管透過性を有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く排除される。

抗原と相互作用するのは軽鎖及び重鎖の可変領域であるため、一本のV<sub>L</sub>と一本のV<sub>H</sub>とにより一本鎖抗体フラグメント(scFvs)が作られており、これは8つのCDRを含み、それらはペプチドリンカ

ー (米国特許第 4,946,778号) により連結された  $V_L-L-V_L$ 。ポリペプチドを成しており、ここで  $L$  はペプチドリンカーを表している。 $V_L$  と  $V_H$  ドメインが配向  $V_L-L-V_L$  である scFv が米国特許第 5,132,405号に開示されている。

完全抗体にとっての最少限の 2 つの結合部位と比べて scFv は一つのそれを有するため、scFv は 2 以上の結合部位を含む抗体に比べて低い活性を有している。

従って、このポリペプチドの活性を高めるため、且つその抗原認識特性を維持又は高めるため、複数の結合部位を有する scFv の構築体を得ることが有利であろう。加えて、標的組織上の別々のエピトープの認識を可能とする、別の免疫エフェクター機能の抗体ベース順増を可能とする、又は治療もしくは診断成分の抗体捕獲を可能とする二価特異的である多価 scFv を獲得することが有利であろう。

それぞれ第一ペプチドリンカーにより共有結合している一本の  $V_L$  と一本の  $V_H$  ドメインとを有する一本鎖抗体フラグメントは、第二ペプチドリンカーによって共有結合されて、完全抗体の結合親和力を維持している多価一本鎖抗体を形成できうることが発見された。一態様において、本発明は抗原に対する親和性を有する多価一本鎖抗体であり、ここでこの多価一本鎖抗体は 2 本以上の軽鎖可変ドメインと 2 本以上の重鎖可変ドメインとを含んで成り、ここで各可変ドメインは少なくとももう一つの別の可変ドメインに連結されている。

別の態様において、本発明は 2 本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成る多価一本鎖抗体であり、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び  
(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；  
を含んで成る。

別の態様において、本発明は、多価一本鎖抗体をコードする DNA 配列を提供し、ここでこの多価の一本鎖抗体は 2 本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；  
を含んで成る。

この多価一本鎖抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいてもっと小さく、より迅速な毛管透過を可能とする抗体フラグメントの構築を可能とする。多価一本鎖抗体は、結合部位が 2 種類の抗原決定基でありうる多価一本鎖抗体の構築も可能とするであろう。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、 $V_L-L-V_L-L-V_L-L-V_H$  (LHLH) と  $V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L$  (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体及び非共有結合型 P<sub>v</sub> 一本鎖抗体 (P<sub>v</sub>2) を示す。

図 2 は CC49V<sub>L</sub> のヌクレオチド配列を示す。

図 3 は CC49V<sub>H</sub> のアミノ酸配列を示す。

図 4 は CC49V<sub>H</sub> のヌクレオチド配列を示す。

図 5 は CC49V<sub>H</sub> のアミノ酸配列を示す。

図 6 は p49LHLH における CC49 一本鎖抗体 LHLH のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図 7 は p49LHHL における CC49 一本鎖抗体 LHHL のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図 8 はプラスミド pSL301T 及び pSL301HT の構築を示す。

図 9 はプラスミド p49LHHL の構築を示す。

図 10 はプラスミド p49LHLH の構築を示す。

図 11 は CC49IgG、CC49scPv2 及び CC49scPv を用いた、競合因子としてビオチニル化 CC49IgG を用いる競合アッセイの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文献の教示全体を引用することで本明細書に組入れる。

模造、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基等を略すとき、それらは IUPAC IUB (Commission on Biological Nomenclature) 又は関連分野の実態に従って略している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」(scFv)又は「抗体フラグメント」なる語は、 $V_L-L-L-V_H$  により表わされる、ペプチドリンカー (L) により  $V_L$  ドメインに連結された  $V_L$  ドメインを含むポリペプチドを意味する。 $V_L$  と  $V_H$  ドメインとの順序は逆であってよく、 $V_H-L-L-V_L$  として表わされるポリペプチドが獲得できうる。「ドメイン」は、独立の機能、例えば抗原結合又は抗原認識を及ぼすタンパク質のセグメントである。

「多価一本鎖抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した 2 以上の一本鎖抗体フラグメントを意味する。この抗体フラグメントは連結されて、

$V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$ ;  $V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L$ ;  $V_H-L-V_L-L-V_H-L-V_L$ ;  
又は

$V_H-L-V_L-L-V_L-L-V_H$

の  $V_L$  と  $V_H$  ドメインの順序を有する二価の一本鎖抗体を形成してよい。

三価以上の一本鎖の多価抗体は、追加のペプチドリンカーによって二価の一本鎖抗体に連結された 1 又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な態様においては、 $V_L$  と  $V_H$  ドメインの数は等しい。

本発明は、

$V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_L$  又は  $V_L-L-V_L-L-V_H-L-V_H$

で表されうる多価の一本鎖抗体も提供する。

$V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$  (LHLH) 及び  $V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L$  (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体を図 1 に示す。非共有結合型 P<sub>v</sub> 一本鎖抗体 (P<sub>v</sub>2) も図 1 に示している。

本発明において利用するための一本鎖抗体フラグメントは任意の抗体の軽鎖及び/又は重鎖可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その軽鎖と重鎖可変ドメインは同一の抗原に特異的である。連結されて多価の一本鎖抗体を構成している個々の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的でありうるか、又は別々の抗原に対して特異的でありうる。

一本鎖の多価抗体についての DNA 配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする遺伝子の起源が必要とされる。適当な DNA 配列は公共の起源から入手するか、又は当業界に公知の標準の手順によって獲得できうる。例えば、The U.S. Department of Health and Human Services により公開された Kabat らの Sequences of Proteins of Immunological Interest 第 4 版 (1991) は、今日まで述べられているほとんどの抗体可変領域の配列を開示している。遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローンする DNA の起

源として、逆転写酵素仲介合成によりmRNAから獲得したcDNA配列を利用することが一般に可能である。抗体に関して、mRNAの起源は広範囲にわたるハイブリドーマから獲得できる。例えば、カタログATCC Cell Lines and Hybridomas, American Type Culture Collection, 20309 Parklawn Drive, Rockville Md., USA (1990)を参照のこと。その中に挙げられている幅広い様々な抗原と反応性のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、そして本発明において利用できる。これらの細胞系及びその他の類似の種類が、可変ドメインをコードするmRNAの起源として、又はモノクローナル抗体自体のアミノ酸配列を決定するために抗体タンパク質を獲得するように利用できよう。

抗体の可変領域は、適当な脊椎動物、通常は家畜動物とそして最も好都合にはマウスを免疫することにより得られもする。その免疫原は腫瘍の抗原であるか、又はハプテンであるとき、キーホールリンベットヘモシアニン(KLH)の如きの抗原に対するこのハプテンの抗原性結合体であろう。免疫化は宿主哺乳動物への通常は2〜3週間置きの免疫原の1又は数回の繰り返し注射によって好適に実施される。通常、最後の免疫の3日後、脾臓を取り出し、そしてmRNAが当業界に公知の標準手順により簡単に獲得できるようにハイブリドーマを供するための細胞融合に利用する単細胞へと解離する。

腫瘍の抗体が獲得でき、そしてそのアミノ酸配列だけを知り得たら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用なV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインは好ましくは、1990年3月3日に公開されたPCT出願NO 80/04410及び1989年1月26日に公開されたPCT出願NO 89/00692に開示されている、腫瘍関連タンパク質72抗原に対する一連のCC抗体の一つから獲得できる。より好ましいのは、PCT公開NO 80/04410及びNO 89/00692に

おいてCC49と表示されているモノクローナル抗体に由来するV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインである。CC49のV<sub>H</sub>をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 1)は図1に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>L</sub>のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 2)は図2に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>H</sub>をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 3)は図3に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>L</sub>をコードするアミノ酸配列(SEQ ID NO: 4)は図4に示すものと実質的に同じである。

本発明の抗体フラグメント及び多価の一本鎖抗体を形成するため、適当なペプチドリンカーを得ることが必要である。V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインを連結するための適当なリンカーは、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインが、一本鎖ポリペプチドであって完全抗体のものと構造に非常に類似する三次元構造を有し、従ってその抗体フラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持しているポリペプチド鎖へと折りたたまれることを可能にするものである。scFvを連結するための適当なリンカーは、各イムノグロブリンフラグメントのV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインが三次元構造であって、その各フラグメントが、そのイムノグロブリンフラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持するような三次元構造を有するように、2以上のscFvを連結することの可能なものである。所望の特性を有するリンカーは、その開示内容を引用することで本明細書に記入する米国特許第4,946,778号に開示の方法により獲得できる。この第4,946,778号に記載の方法により作られたポリペプチド配列より、ポリペプチドをコードする遺伝子配列が獲得できる。

好ましくは、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインを連結してscFvを形成せしめるペプチドリンカーと、2以上のscFvを連結して多価の一本鎖抗体を形成せしめるペプチドリンカーとは実質的に同じアミノ酸配列を有

する。

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その個々の抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗原認識部位の結合能力を妨害しないように付加されていることも必要である。

好適なリンカーは、PantolianoらのBiochem., 30, 10117-10125 (1991)に開示されている205Cと称されているヘリカルリンカーを基礎とするが、その最初と最後のアミノ酸は、一端にあるXhoI部位と、他端にあるHindIII部位により指定されるコドンで理由に改えられている。

好適なリンカーのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 5)は下記の通りである：

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu。

このリンカーは一般に10〜50のアミノ酸残基である。好ましくは、このリンカーは10〜30のアミノ酸残基である。より好ましくは、このリンカーは12〜30のアミノ酸残基である。最も好ましくは、このリンカーは15〜25のアミノ酸残基である。

本発明の分子の製造のための発現媒体にはプラスミド又はその他のベクターが含まれる。一般に、かかるベクターは宿主細胞と適合性により由来するレプリコンとコントロール配列とを含む。このベクターは通常レプリコン部位、及び形質転換細胞の中での表現型選別を供することのできる特定の遺伝子を保有している。例えば、大腸菌(*E. coli*)はpBR322を用いて容易に形質転換される(Bolivarら、Gene, 2, 95-(1977)又はSambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York, 第2版(1989))。

真核細胞にとって適当なプラスミドも利用できよう。S. セレビ、ジェ(*S. cerevisiae*)又は一般のパン酵母が真核微生物の中で最も

一般的に利用されているが、数多くのその他の株、例えばピシアバストリス(*Pichia pastoris*)が有用である。多細胞生物、例えばATCCより入手できるSP2/O又はチャイニーズハムスター卵巣に由来する細胞の培養物も宿主として利用できよう。哺乳動物細胞にとって適当な典型的なベクタープラスミドはpSV2neo及びpSV2gpt(ATCC); pSVL及びpKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1/pML2d (International Biotechnology, Inc.)である。

本発明のポリペプチドについての遺伝子を発現するための原核及び真核ウィルス発現ベクターの利用も考慮される。

この発現ベクター及びこの一本鎖の多価抗体をコードするインサートは、その挿入連結部において適合性制限部位を有し、且つその制限部位が挿入の領域にとって固有であることが好ましい。ベクター及びインサートの両者とも制限エンドヌクレアーゼにより処理し、次いで任意の様々な方法、例えばSambrookら、前掲に記載の方法によりリゲートする。

本発明の一本鎖の多価抗体の製造にとって好適なベクターの遺伝子構築体は、構成的に活性な転写プロモーター、新生一本鎖ポリペプチドの合成/細胞の外への分泌を誘導するシグナルペプチドをエンコードする領域を含むものである。好ましくは、その発現速度は、不溶性物質としてそのポリペプチドが蓄積することを避けるために最適、折りたたみ及び成熟過程とつり合う。レプリコン及びコントロール配列に加えて、一本鎖ポリペプチドの最適な合成にとって追加の要素が必要とされる。これらの要素にはスプライスシグナル、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが含まれる。更に、追加の遺伝子及びその生成物が成熟及び折りたたみを助長するために必要とされる(シャペロン)。

市販されているベクターはベクターにとって上記の基準を満たす

ように簡単に改変されうる。かかる改変は入手できる書物及び本明細書における教示により、当業者によって容易に実施される。

更に、このクローニングベクターは選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカー、又は宿主細胞による選択できる特徴の発現を引き起こすその他のマーカーを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、組換えDNA技術を用いて構築されたベクターにより組換的に形質転換されうる細胞である。薬剤耐性又はその他の選択マーカーは形質転換の選別をある程度助長することを意図する。更に、選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカーの存在は、夾雑微生物が培養培地の中で繁殖することを防ぐうえで利用されうる。この態様において、かかる純粋な形質転換細胞の培養物は生存のために開発された表現型を必要とする条件のもとで細胞を培養することにより得られるであろう。

本発明の回収及び精製は当業界に公知の標準技術を利用して達成されうる。例えば、もしそれらが培養培地の中に分泌されるなら、この一本鎖の多価抗体は限外濾過により濃縮されうる。そのポリペプチドが宿主細胞のペリプラズマ空間へと輸送されるなら、精製はその細胞に浸透圧ショックを与え、次いで限外濾過、抗原アフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いるカラムクロマトグラフィー及びゲル濾過を実行することにより達成されうる。不溶性であり、且つ屈折体(refractile bodies)、通称封入体として存在しているポリペプチドは、細胞の溶解、封入体を単離するための遠心と洗浄の繰り返し、例えばグアニジン-HClによる可溶化、及び再度の折りたたみ、それに続く生物活性分子の精製によって精製できうる。

一本鎖の多価抗体の活性は当業界に公知の標準アッセイ、例えば競合アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)及びラジオイムノアッセイ(RIA)により測定できうる。

IEP	等電点電気泳動
Kbp	キロ塩基対
LB	Luria-Bertani 培地
Mab	モノクローナル抗体
MES	2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸
MW	分子量
NBT	ニトロブルーテトラゾリウムクロリド
オリゴ	オリゴヌクレオチド
PAG	ポリアクリルアミドゲル
PAGB	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PBS	リン酸緩衝食塩水
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
pSCPV	SCPVをコードするDNA配列を含むプラスミド
RIGS	ラジオイムノガイド外科
RIT	ラジオイムノ治療
scPv	一本鎖Pvイムノグロブリンフラグメントモノマー
scPvs	共有結合した一本鎖Pvイムノグロブリンフラグメントダイマー
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
TBS	トリス緩衝食塩水
トリス	(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン)
TTBS	ツイーン20洗浄液
V <sub>H</sub>	イムノグロブリン重鎖可変ドメイン
V <sub>L</sub>	イムノグロブリン軽鎖可変ドメイン

#### 抗体

CC49: ヒト腫瘍関連タンパク質72(TAG-72)に特異的なネズミモノクローナル抗体; ATCC No. HB9459として寄託。

本発明の多価の一本鎖抗体は診断及び治療における利用に固有の利点を供する。この多価の一本鎖抗体の利用は、大きめのフラグメント又は抗体分子全体の利用に勝る数多くの利点を供する。それらはその標的組織により迅速に到達し、そして身体からより迅速に排除される。

診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は1又は複数の抗体フラグメントが標的組織に対して特異的であるように、及び/又は複数の抗体フラグメントが診断もしくは治療因子に対して特異的であるように構築されうる。

本発明は更に、癌の如きの障害の診断及び/又は治療において有用な特に好都合な高理組成物も考慮しており、ここでこの標的抗原はしばしば細胞の表面で発現される。診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は適当なイメージ又は治療剤に当業界に公知の方法によって抱合されうる。本発明の高理組成物は当業界に公知の方法、例えば常用の混合、溶解又は凍結乾燥工程によって調製される。

本発明を、その単なる例示を意図する下記の実施例の考慮により更に明らかにする。

#### 略 語

BCIP	5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート
bp	塩基対
Bis-Trisプロパン	(1,3-ビス(トリス(ヒドロキシメチル)-メチルアミノ)プロパン)
BSA	牛血清アルブミン
CDR	相補性決定領域
ELISA	酵素結合免疫吸着アッセイ
Fv2	非共有一本鎖Pvダイマー

CC49PAB: 重鎖のN-末端領域に連結している完全領域より成るCC49の抗原結合性領域。

CC49scPv: ペプチドリンカーにより連結されているCC49抗体の二本の可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CC49Pv2: ダイマーを構成するように非共有結合している2つのCC49scPv。Pvの後ろの数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えばCC49Pv6は六量体の多量体を意味する。

CC49scPv2: 3つのリンカーにより連結されている、2本のCC49V<sub>H</sub>ドメインと2本のV<sub>L</sub>ドメインとより成る共有結合型一本鎖抗体フラグメント。V<sub>L</sub>(L)とV<sub>H</sub>(H)ドメインとを連結し合わせるのに6つの可能な順序の組合せがある: LHLH, LHHL, LLHH, HLLH, HLHL及びHHLL。

#### プラスミド

pSCPV UHM: 25のアミノ酸リンカーにより連結されている、CC49の可変重鎖とCC49可変重鎖とより成るscPvについてのコード配列を含むプラスミド。

p49LHLH又はp49LHHL: CC49scPv2 LHLH又はLHHL生成物のそれぞれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

#### 実施例

##### 一般実験

分子クローニングのための手順は、その開示内容を引用することによって本明細書に組入れる。Sambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York 第2版(1989)及びAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1992)に記載の手順である。

ここで用いた水は全て脱イオン蒸留水とした。

オリゴヌクレオチドの合成及び精製

オリゴヌクレオチド(オリゴ)は全て、標準の $\beta$ -シアノエチルホスホラミジット及び合成カラムを用い、Applied Biosystems (Foster City, CA) 由来のModel 380A又はModel 391 DNA合成装置のいずれかで合成した。その生成物上の保護基は、濃水酸化アンモニウムの中で55℃で8~15時間加熱することにより除去した。水酸アンモニウムはエバポレーションを介して除去し、そしてその粗混合物を30~40 $\mu$ lの滅菌水の中に再懸濁させた。ポリアクリルアミド-尿素ゲル上での電気泳動の後、オリゴを短波紫外(UV)光を用いて可視化させた。DNAバンドをゲルから切り出し、そして1mlの100mMのトリス-HCl, pH 7.4, 500mMのNaCl, 5mMのEDTAの中で65℃で2時間かけて溶解させた。最終精製は、DNAをSep-Pac(商標) C-18カラム(Millipore, Bedford, MA)に適用し、そして結合したオリゴを60%のメタノールで溶解させることによって行った。その溶液の体積を約50mlに下げ、そしてDNA濃度を260nm (OD<sub>260</sub>)での光学密度を測定することにより決定した。

制限酵素消化

制限酵素消化は全て、Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) 又はBoehringer Mannheim (BW, Indianapolis, IN)の酵素及び緩衝液を用い、その製造者の推奨する手順に従って実施した。消化させた生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離させた。そのゲルをエチジウムブロミドで染色し、そのDNAバンドを短波UV光により可視化させ、次いでそのDNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5mMのトリス、2.5mMの酢酸、1mMのEDTA, pH 8.0を含む透析チューブ(Union Carbide Corp., Chicago)の中に入れ、そしてMax Submarine電気泳動装置(Hoefer Scientific Instruments,

CA)を用いて溶解させた。サンプル容量をSpeed Vac濃縮器(Savant Instruments, Inc., NY)で下げた。DNAをエタノール沈殿させ、そして滅菌水の中で再溶解させた。

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

Johnsonら, Can. Res., 46, 850-857 (1986)に実質的に記載の通りに調製したTAG-72抗原を、ポリビニルクロリド96穴マイクロタイタープレート(Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA)のウェルの上に一夜乾燥させることで吸着させた。そのプレートをPBS中の1%のBSAで31℃で1時間ブロックし、次いで200 $\mu$ lのPBS, 0.05%のツイーン50で3回洗った。25 $\mu$ lの試験抗体及び25 $\mu$ lのビオチニル化CC49 (1/20,000希釈率の1mg/mlの溶液)をウェルに加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。プレートに結合したTAG-72、ビオチニル化CC49、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの相対量、及び発色時間は、余計な抗体又はビオチニル化CC49がないように、しかもscPvによる結合を検出するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5 $\mu$ g/mlのCC49及び10 $\mu$ g/mlのCC49Fabとした。陰性コントロールはPBS中の1%のBSA及び/又は濃縮Bとした。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼの抱合された1:1000の希釈率のストレプトアビジン50 $\mu$ l (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL)を加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。そのプレートを更に3回洗った。50 $\mu$ lのパラニトロフェニルホスフェート溶液(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)を加え、そして発色反応を最低20分待たせた。scPv2結合の相対量をマイクロプレートリーダー(Molecular Devices Corporation, Menlo Park, CA)を用い404~450nmでの光学密度スキャンに

より測定した。scPv2の結合は、発色の同時低下を伴うビオチニル化CC49の結合の低下をもたらした。

SDS-PAGE及びウェスタンブロッティング

SDS-PAGE分析のためのサンプル(20 $\mu$ l)を、非還元用サンプル調製バッファー-Sepasol 1(Integrated Separation Systems(ISS), Natick, MA)の中で5分間煮沸することにより調製し、そして10~20%勾配のポリアクリルアミド Dalichi Minigeliにその製造者の仕様書(ISS)に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2-ゲル装置(ISS)を用い、ゲル当たり55mAで、一定の電流で約75分待った。ゲルをクマジーブリアントブルーR-250 (Bio-Rad, Richmond, CA)の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子重量標準品は予め染められており(Mid Range kit, Diversified Biotech, Newton Center, MA)、そして下記のタンパク質を含んでいた: ホスホリラーゼb、グルタマートデヒドロゲナーゼ、オバルブミン、ラクトールデヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、B-ラクトグロブリン及びチトクロームC。対応の分子量はそれぞれ96,000, 55,000, 43,000, 36,000, 28,000, 18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デュプリケートのゲルも泳動した。電気泳動後、ゲルの一方を陽極バッファー#1(0.3Mのトリス-HCl, pH10.4)の中で15~20分平衡にした。Immobilon-P-PVDF(ポリビニルデンジクロリン)膜(Millipore, Bedford, MA)をメタノールで2分処理し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に陽極バッファー#1の中で3分平衡にした。Milliblot-SDE装置(Millipore)を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に転写するために用いた。一層の陽極バッファー#1を陽極電極面の中央に載せた。Whatman 3MM濾紙のシートを陽極バッファー#1の中に浸し、そしてその電

極面の上に滑らかに置いた。陽極バッファー#2(25mMのトリス, pH10.4)の中に浸した別の濾紙を一枚目の上に載せた。次に濡れたPVDF膜を加え、平衡ゲルをその上に載せ、そして最後に陰極バッファー(40mMのグリシン中の25mMのトリスHCl, pH9.4)の中に浸した濾紙のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250mMの定常電流(初期電圧は8~20ボルトに範囲した)を用いて30分で通せられた。

ブロットした後、その膜を水の中で簡単にすすぎ、そして20mlのブロッキング溶液(トリス緩衝食塩水(TBS)中の1%の牛血清アルブミン(BSA)(Sigma, St. Louis, MO))を有する皿の中に入れた。TBSはPierce Chemical (Rockford, IL)より、予備秤量粉末として購入し、500mlの水を加えたとき、その混合物は25mMのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を提供する。これらの膜を最少限1時間、周囲温度でブロックし、そして20mlづつの0.5%のツイーン20洗浄液(TTBS)を用いて5分間3回洗った。TTBSを調製するには、0.5mlのツイーン20(Sigma)をTBSのリッター当り混合した。使用したプローブ抗体は20mlのビオチニル化PAID 14増液とした(10 $\mu$ g/20mlの抗体バッファー)。抗体バッファーは100mlのTTBS当り1gのBSAを加えることにより作った。周囲温度で30~60分プローブした後、その膜を上記の通りTTBSで3回洗った。

次に、その膜を周囲温度において30~60分、抗体バッファーの中で1:500希釈率のアルカリホスファターゼの抱合されたストレプトアビジン(Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL)20mlとインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この後繰り返した。発色反応の前に、膜を炭酸アルカリバッファー(20ml)の中で2分洗った。このバッファーは0.1Mの炭酸水素ナトリウム、1mMのMgCl<sub>2</sub>・H<sub>2</sub>O, pH9.8とした。アルカリホスファターゼにとっ

の基質を作るため、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)クロリド(50mg, Sigma)を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これらの溶液も、Promegaよりウェスタン発色剤として市販されている。発色のため、それぞれ120μlを上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで発色膜からそれらを水で洗い流した。

#### ビオチニル化 PAID 14

PAID 14は、CC49に対して特異的な、ATCC No. CRL10256として寄託されているネズミの抗-イディオタイプ抗体(IgG2a, Kアイソタイプ)である。PAID 14をNygene Protein Aアフィニティーカラム(Yonkers, NY)を用いて精製した。製造者のプロトコルに従ったが、ただし溶離バッファーとして0.1Mのクエン酸ナトリウム、pH 3.0を用いた。画分を1.0Mのトリス-HCl pH 9.0を用いてpH 7に中和した。ビオチニル化反応は下記の通りに設定した。PAID 14(1mg、水の中で100μl)を100μlの0.1MのNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、pH 9.6と混合した。ビオチニル-e-アミノ-カプロン酸N-ヒドロキシスクシニミドエステル(Biotin-X-NHS)(Calbiochem, LaJolla, CA)(2.5mg)を0.5mlのジメチルスルホキシドの中に溶かした。Biotin-X-NHS溶液(20μl)をPAID 14溶液に加え、そして22℃で4時間反応させた。過剰のビオチン及び不純物を、Pharmacia Superose 12 HR10/30カラム(Piscataway, NJ)を用いてゲル濾過により除去した。0.8μl/minの流速で、ビオチニル化 PAID 14は18.8minのピークで出現した。このピークを構成する画分をプールし、そして4℃で保存し、そしてCC49V<sub>6</sub>及びV<sub>8</sub>CDRにより決定

されるCC49イディオタイプを後出するのに用いた。

#### 等電点電気泳動(IEP)

等電点(pI)は、DNASTAR(Madison, WI)を介して入手できるPROTEIN-TITRATORという名のコンピュータープログラムを用いて推定した。入力してある配列によるアミノ酸組成に基づき、pIに加えてMW値が得られた。Cys残基は電荷に寄与するため、Cysについての計数は0に調整し、なぜならそれらは全てジスルフィド結合に関与するからである。

実験的にpIを、Isogelアガロース IEPプレート、pH域3~10(PMC Bioproducts, Rockland, MA)を用いて決定した。Biorad Bio-phoresis 水平電気泳動セルを、IEPを行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、500ボルト(限界)、20mAの電流及び10Wの定常電力とした。等電点泳動は90minで完了した。IEP標準品はBioradより購入した。そのキットはフィコシアニン、β-ラクトグロブリンB、牛炭酸アンヒドラーゼ、ヒト炭酸アンヒドラーゼ、馬ミオグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3レンヂルレクチン及びチトクロームCを含み、それらのpI値は4.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.10及び7.50, 7.80, 8.00並びに8.20及び8.60である。ゲルを、PMCにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

#### CC49抗体量の定量

IgG, scFv2の種および単量体scFvを含む精製CC49抗体はすべて、適合している1.0cm光路長の石英製キュベット(Hellma社)およびPerkin-Elmer UV/VIS 分光光度計552A型を用いて、タンパク質希釈液の280nm波長光の吸光度を測定して定量した。モル吸光係数(E<sub>1</sub>)は、各抗体について、下記式を用いて測定した。

$$E_1 = (\text{Trp数}) \times 5,500 + (\text{Tyr数}) \times 1,340 + ((\text{Cys数}) \times 150 + (\text{Phe数}) \times 10)$$

これらの値は、D.B.Wallaufer, Advances in Protein Chemistry, 17巻, 375~378頁に記載されている情報に基づいている。

#### 高性能液体クロマトグラフィー

CC49scFv2を精製するために行った高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、金体にチタンまたはテフロン製配管を用いたLKB HPLCシステムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2152型制御器、276nmの吸光度に設定されたUV CORD S II 2238型検出装置および2211型 SuperRac fraction collectorで構成されている。

#### サブユニットのPCRによる製造

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)はすべて、150ピコグラム(pg)のプラスミドDNA(pSCPVOHM)：100ピコモルのプライマー：1μlのPerkin-Elmer-Cetus社(米国、コネティカット州、ノーウォーク所在)のAmpli-Tagポリメラーゼ：18μlの10mM dNTPおよび10μlの10×緩衝液(両者ともにPECキットに提供されている)：ならびに合計容積を100μlにするのに十分な水で構成された反応混合物で行った。PCR反応はメーカーが記載しているのとはほとんど同様にして行った。これらの反応は、PEC 9600型サーモサイクラー(thermocycler)を用いて30サイクル行ったが、その1サイクルは、94℃で20~45秒間のDNAの変性；52~80℃で0.5~1.5分間のアニーリングおよび72℃で0.5~2.0分間の伸長で構成されている。オリゴヌクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社(米国、カリフォルニア州、ホスター・シティ所在)の380A型もしくは391型DNA合成器で合成し次いで上記のようにして精製した。

#### リゲーション

100ngのベクターDNAおよび対応する1：1化学量論的当量のインサートDNAを用いるリゲーション反応を、Stratagene社(米国、

カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在)のT4 DNAリガーゼキットを用い、該メーカーの指示にしたがって行った。リゲーション反応物(全容積20μl)は最初18℃でインキュベートし、次いで一夜4℃まで徐々に冷却した。

#### 形質転換

形質転換は、100μlのStratagene社の大腸菌(E. coli) AG1コンピチント細胞(米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在のStratagene社)を用い、メーカーの指示によって行った。上記リゲーション反応物由来のDNA(1~5μl)を使用した。形質転換ステップの後、細胞は、混合を続けながらルリアブロス(LB)中で37℃で1時間再生させ、続いて、pSCPVOHM, p49LHLHもしくはp49LHLHに用いる20μg/mLのクロラムフェニコール含有(CAM20)ルリア寒天上にプレートし、またはプラスミドpSL301を含有するクロームもしくはpSL301由来のその後の構築物に用いる100μg/mLアンピシリン(AMP100)ルリア寒天プレート(LB-AMP100)上にプレートした。

#### 大腸菌クロームのスクリーニング

細菌プラスミドは、Promega社(米国、ウィスコンシン州、マディソン所在)のMagicミニニープラスミド製造キットを用いて、淘汰圧(selection pressure)を維持するため適切な薬剤を含有するLBブロス培養物から単離した。このキットはメーカーの取扱説明書にしたがって使用した。

#### プラスミドの構築

p49LHLHおよびp49LHLHと命名された2種のプラスミドを、多価の一本鎖抗体を製造するために構築した。p49LHLHを含有する宿主細胞は、V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>で蓋することができるポリペプチドを産生した。ここでV<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>はCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびリンカー(L)は、下記SEQ ID NO: 5の配列を有する

25個のアミノ酸のリンカーである。

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu

p49LHBLを含有する宿主細胞は、V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>で表すことができるポリペプチドを産生した。ここでV<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>はCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびしは上記アミノ酸配列を有するペプチドリッカーである。

CC49V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>(p49LHBL)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 6)とアミノ酸配列(SEQ ID NO: 7)を図6に示す。CC49V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>(p49LHBL)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 8)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 9)を図7に示す。

#### pSL301HTの構築

pSL301HTの構築を図8に示す。バシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)のペニシリナーゼP (penP) ターミナーターの配列を、NheIおよびBamHIで45分間消化することによって、pSCPV UHMと命名されたプラスミドから取出し、電気泳動を行った後、4.5%ポリアクリルアミドゲルから切り取り、電気泳動させ、エタノールで沈降させ、次に、同様に製造されたベクター：pSL301 (米国、カリフォルニア州、サンディエゴ所在のInvitrogen社)中の同じ部位に連結した。pSCPV UHMの製造手順は、1982年8月21日付け出願の米国特許第07/935,895号に記載されている。なおこの出願の開示事項は本願に援用するものである。一般に、pSCPV UHMは、penPプロモーターのヌクレオチド配列：固有NcoI制限部位：CC49V<sub>L</sub>領域：HindIII制限部位：25個のアミノ酸のリンカー：固有XhoI制限部位：CC49V<sub>H</sub>領域：NheI制限部位：penPターミナーター；およびBamHI制限部位を含有している(図8参照)。このpenPプロモーターとpenPターミナーターは、Mezsesら、J. Biol. Chem., 258巻、

11211~11218頁、1983年に記載されている。

上記のリゲーション反応物の一部(8μL)を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートし次いで一夜増殖させたコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換するのに用いた。penPターミナーター、インサートを含有するポテンシャルクローンを、Pharmacia社(米国、メリーランド州、ガイサースバーグ所在)の77 Quickprime \*\*P DNA標識キットと、Bulowelsら、Nucleic Acid Research, 17巻、452頁、1989年に記載されているマイクロ波によるコロニー溶解法とともに用いてスクリーニングした。プローブは、penP-NheI-BamHIターミナーターフラグメント自体であるが、Quickprimeキットによって提供された指示によって製造し使用した。陽性プローブであり、かつBamHIおよびNheIによる消化物由来の207個の塩基対挿入断片(図6に示す1958~2165の塩基対(bp))を含有するクローンをpSL301Tと命名し、次いでCC49VHに対するヌクレオチド配列を含有するpSL301HTを構築するのに選択した。NheI-BamHI penPターミナーターをpSL301中に配置した理由は、そのNheIとBamHIの部位の間のポリリンカー領域中に存在するEco47III制限エンドヌクレアーゼ部位を除くためであった。このことは、Eco47III部位が、構造体中に各連続V領域を配置するのにユニークである必要があるV<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>の領域を結いて構築するため設計された。各V領域がEco47III-NheI部位に付加されると、Eco47IIIは各場合に破壊されて、ユニーク挿入断片に入ってくる次のEco47III部位を形成した。

V<sub>L</sub>配列は、PCR増幅の標的としてpSCPV UHMを用い、オリゴの5' SCP1と3' オリゴSCP5によってPCRで作製した。SCP1に対するDNA配列(SEQ ID NO: 10)とSCP5に対するDNA配列(SEQ ID NO: 11)は次のとおりである。

SCP1: 5' -TAAA CTC GAG GTT CAG TTG CAG CAG-3'

SCP5: 5' -TAAA GCT ACC ACCA ACC GCT TAG TGA GCA GCG GAT GCA TGA GGT-3'

下線をつけた部分はエンドヌクレアーゼ制限部位を示す。

増幅されたV<sub>L</sub>DNAを、4%のPAG、電気泳動、エタノールによる沈降および20μL水への溶解によって精製した。そのV<sub>L</sub>配列をXhoIとNheIの制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化され続いて精製されたpSL301Tベクターに対するインサートとして用いた。標準のリゲーション反応を行い、次いで一部分(4μL)を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換させた。形質転換された細胞を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。CC49V<sub>L</sub>インサートを含有していることを示す候補的クローンをNheIおよびXhoI消化スクリーンから取出した。

United States Biochemical (USB)社(米国、オハイオ州クリーブランド所在)のSequence Kit、および配列決定用プライマーpSL301SEQB (pSL301ベクター中、XhoI部位から57bp上流においてアニールした21bpの配列決定プライマー)とCC49VHPを用いて、DNAの配列決定を行って、CC49V<sub>L</sub>の配列を確認し、pSL301HT中に正しいCC49V<sub>L</sub>配列を有するクローンを明らかにした。このプラスミドはpSL301-HHLTおよびpSL301-HLHTの両者を構築するときの出発点で使った。使用した配列決定用のオリゴをここに示す。

pSL301SEQB(SEQ ID NO: 12)およびCC49V<sub>L</sub>(SEQ ID NO: 13)のオリゴヌクレオチド配列は次のとおりである。

pSL301SEQB: 5' -YCG TCC GAT TAG GCA AGC TTA-3'

CC49VHP: 5' -CAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG-3'

#### 実施例1 p49LHBLの構築

pSL301HT(5μg)を抽出物質として用い、これをEco47IIIおよびNheIで消化し、大きい方のベクターフラグメントを精製した。CC49V<sub>L</sub>挿入フラグメントは、5'オリゴとしてSCP5Cを用いかつ

3'オリゴとしてSCP5を用い、PCRによって製造した。SCP5Bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 14)は下記のとおりである。

SCP5B: 5' -TAAA TCC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT GGC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT-G'

またオリゴSCP5Bはリンカーのコーディング領域の一部(SEQ ID NO: 14のbp8~76)を含有している。pSCPV UHM中のCC49VHP標的のアニールするよう設計された該オリゴの部分は、SEQ ID NO: 14中のbp77~80由来のものである。

下線をつけた配列はPspI部位に相当する。得られたPCRインサートを精製し、PspIとNheIで消化し次いでpSL301HT Eco47III-NheIベクターとのリゲーション反応に用いた(図7)。コンピテント大腸菌AG1細胞を、このリゲーション反応物(8μL)で形質転換を行うのに用い、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。pSL301HHT生成物を示す正しい大きさのXhoI-NheIインサートを有する2個のクローンの配列をオリゴSQP1を用いて決定し、正しい配列(図7のヌクレオチド1124~1543)を有する単クローンをその後の構築に用いるのに選んだ。SQP1のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 16)は下記のとおりである。

SQP1: 5' -TG ACT TTA TGT AAG ATG ATG T-3'

最終のリンカーV<sub>L</sub>サブユニット(bp1544~1983、図7)は、5'オリゴのSCP7bと3'オリゴのSCP8aを用いかつPCRの標的としてpSCPV UHMを用いて製造した。SCP7bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 17)は下記のとおりである。

SCP7b: 5' -TAAA TCC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT GGC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAG ATT GTG ATG TCA CAG TCT CC



下線をつけたヌクレオチドは PspI 部位である。SCP8aのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 18)は下記のとおりである。

SCP8a: 5' -TAA GCT AGC TTT TTA CTT AAG CAC  
CAG CTT GGT CCC-3'

下線をつけた最初の二組は NheI 部位に相当し、もう一つの組は AflII 部位に相当する。SCP70のヌクレオチド8~76はリンカーをコードし(図7のヌクレオチド1544~1612)、一方V<sub>h</sub>にアニールするヌクレオチド77~99は図7の1613~1635に相当する。プライマー SCP8aは、その5'末端の短いテール、NheI 制限部位、終止コドン、AflII 制限部位およびV<sub>h</sub>の最後の21個の塩基を含有している。PspI と NheI による消化の後、この得られた 420bp のインサートを精製して精製 pSL30HHT ベクターの NheI と Eco47III の部位に連結し、候補的なクローンを NheI と XhoI でスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されかつ 48LFR2 (-) と SQP1 で配列が決定されて、pSL30IHHT に新たに挿入された配列が確認された。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 19)は下記のとおりである。

48LFR2 (-): 5' -CTG CTG GTA CCA GGC CAA G-3'

プラスミド pSL30IHHT を XhoI および NheI で消化し、精製し、得られた 1179bp V<sub>h</sub>-リンカー-V<sub>h</sub>-リンカー-V<sub>h</sub> セグメントを pSCPV UHM に連結して p48LHHL を製造した。なおこの pSCPV UHM は同じ制限酵素で切断されその大きい方のフラグメントを精製したものである。そのリゲーション反応生成物(4μl 部分)を用いてコンピテント大腸菌 AG1 細胞(Stratagene社)を形質転換し、LB-CAM20 寒天プレートにプレートした。正しい制限酵素地図を有するプラスミドを含有する単クローンを、p48LHHL を含有させるために選択した。p48LHHL は、CC49 多価一本鎖抗体 scPv2: V<sub>h</sub>-L-V<sub>h</sub>-L-V<sub>h</sub>-L-V<sub>h</sub> または CC49 scPv2 (LHHL) の penP プロモーターとヌクレオチ

ド配列を含有している。

#### 実施例 2: p49LHHL の構築

p49LHHL の構築を図 11 に図式的に示す。リンカー-V<sub>h</sub> のサブユニットを 5' オリゴの SCP7b と 3' オリゴの SCP9 で製造した。

SCP9: 5' -TAA ACC TAG CAC CAA CGC CTT AGT TTC  
ACC ACC ACC TTG GTC CCA G-3'

SCP7b オリゴ(ヌクレオチド8~76)は図8のリンカーをコードし(ヌクレオチド1124~1182に相当する)および図6のV<sub>h</sub>のヌクレオチド1183~1215に相当する。PCR に対する pSCPV UHM 的(ヌクレオチド77~99)にアニールした。

SCP8 は、NheI 部位(第一の下線をつけたヌクレオチド)と Eco47III 部位(第二の下線をつけたヌクレオチド)を有し、これらの部位は次の V 領域を受けるための pSL30IHHT を作るのに必要な制限部位である。SCP8 のヌクレオチド18~23は図6のヌクレオチド1532~1537(リンカーの最初の2個のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方ヌクレオチド24~48は、PCR における SCP8 のアニール領域である図8に示すヌクレオチド1508~1581に相当する。プラスミド pSL30IHHT を Eco47III と NheI で消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、予め PspI と NheI で処理され精製された、PCR からのリンカー-CC49V<sub>h</sub> DNA インサートと連結させる。その連結混合物(3μl)を用いて大腸菌 AG1 コンピテント細胞を形質転換し、次いで正しい XhoI-NheI の大きさのフラグメントを有する一つのコロニーの配列をオリゴ PBNPTSEQ2 を用いて決定した。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 21)は下記のとおりである。

5' -TTG ATC ACC AAG TGA CTT TAT G-3'

配列決定の結果は、得られた pSL30IHHT クローン中に PCR の誤まり

と欠失があるということを示した。図6にみられるヌクレオチド1533~1537に相当する5個の塩基の欠失がみとめられ、そしてTであるべきはずのヌクレオチド1581はDNA配列のデータから確認したところ実際にはGであった。得られた配列は、

5' ...GAAGCGCTT...であった。

こゝで下線をつけた配列は偶然に Eco47III 部位を形成した。図6のAGCGCTの配列はヌクレオチド1530, 1531, 1532, 1538, 1539および1540に相当する。この誤まりは次のステップで修正され、オリゴ SCP8C の末端に5塩基の欠失を補正することによって pSL30IHHT を製造した。

SCP8C: 5' -TAAGCGCTGATGATGCTAAGACGACGCCCAAAAA  
GCACGACGCAAAAAAGATGATGCAAAAAAGGATCTGG  
AGTTTCAGTTGCAGCAGCTGAC-3'

SCP8C 中の下線をつけた配列は Eco47III 部位に相当する。PCR において、SCP8C は 5' オリゴとして用いられ一方 SCP10 は 3' オリゴとして用いられ、リンカー CC49V<sub>h</sub> セグメントが生成する。SCP10 のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 23)は下記のとおりである。

SCP10: 5' -TTG TGC TAG CTT TTT ATG AGG AGA CGG TGA  
CTG AGG TT-3'

SCP10 中の下線をつけた配列は図6のヌクレオチド1858~1863に見られる NheI 部位に相当する。この場合、PCR インサートは NheI だけで消化され次いで精製される。ベクター(pSL30IHHT)はEco47III 部位(先に形成されている)および NheI 部位で消化され次いで精製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(3μl)を使ってコンピテント イー・コリ AG1 細胞を形質転換した。この形質転換細胞を LB-AMP100 プレート上にプレートし次いで候補的クローンを XhoI と NheI でスクリーニングした。正しい大きさ

の DNA を有する3個のクローンを得た。これらのクローンのうちの2個は、オリゴ 48VLCDR3 (+) および SQP1 を用いて配列を決定した。そのヌクレオチド配列(48VLCDR3 (+) の DWQ ID NO: 24)は下記のとおりである。

48VLCDR3 (+): 5' -CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローンが得られ、そして図6のヌクレオチド1533~1863からの配列が確認され、正しい pSL30IHHT クローンを示した。

大腸菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミド p49LHHL を製造するために、pSL30IHHT (5μg) を NheI と XhoI で消化し、次いで V<sub>h</sub>-L-V<sub>h</sub>-L-V<sub>h</sub> 配列を含有する小さい方のインサートを精製した。この断片を、pSCPV UHM (5μg) を XhoI と NheI で消化して得た大きい方のベクターフラグメントの精製物と連結した。上記連結混合物の一部(4μl)を使ってコンピテント大腸菌 AG1 細胞を形質転換した。得られた形質転換混合物を LB-CAM20 プレート上にプレートし、次いで p48LHHL に対する代表的なクローンを、正しい制限酵素地図(図10参照)および TAG-72 に対する生物活性に基づいて選択した。

#### 実施例 3: CC49 scPv2 の LHLH と LHHL が共有結合した二量体の精製

CC49 の共有結合した一本鎖二量体(scPv2)の精製を行うために、大腸菌のペリプラズマ細胞質の画分を、p48LHHL と p49LHHL の両者の 1.0L の一夜培養物から調製した。要約すると、培養物を 250mL づつの4部分に分割し、Sorvall GS-3 ロータで10分間 5000rpm で遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、30mM NaCl を含有する 10mM トリス-HCl pH 7.3 からなる 100mL 中に再懸濁させた。細胞を再びペレット化し、合計 100mL の 30mM トリス-HCl pH 3 で洗浄し、そして一つのチューブにプールした。このチューブに、40mV %

のスクロースを含有する30mMトリス-HCl pH 7.3(100mL) および10 mM EDTA pH 7.5(2.0mL) を添加した。得られた混合物を、時々攪拌しながら、室温に10分間保持した。高張性細胞 (hypertonic cell) を前記のようにしてペレット化した。次のステップでショックを与えて、該ペレットを20mLの水冷 0.5mM MgCl<sub>2</sub>中に速やかに懸濁させ、次いで時々攪拌しながら氷上に10分間保持した。その細胞を前記のようにしてペレット化し、大腸菌の周辺細胞質の画分を含有する上澄み液を、0.2μmの Nalgene社 (米国、ニューヨーク州、ロチェスター所在) の濾過装置で濾過することによってさらに清澄にし、次いでAmicon社 (米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在) の Centrifuge 30およびCentricon 30で1.0mLより小さい容積まで濃縮した。

p49LHLHまたは p49LHHLのクローン由来の濃縮周辺細胞質のショック (shock) を、Pharmacia社 (米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ所在) の Superdex 75 HR 10/30 HPLC カラム (予めPBSで平衡化させたもの) に注入した。競合 ELISA法で測定する場合、問題の生成物は0.5mL/分の流量で21~24分間放出させた。活性画分をブールし、先に述べたようにして濃縮し、次に、システム500 Microdialyser Unit (Pierce Chemical社) を用い、緩衝液を3~4回変えながら8000MWカットオフ膜を使用して、20mMトリス-HCl pH 7.6に対して一夜透析を行った。その試料を Pharmacia社の Mono Q HR 5/5 アニオン交換HPLCカラムに注射した。緩衝液Aとして20mMトリス-HCl pH 7.6を用い、緩衝液Bとして20mMトリス-HCl pH 7.6+0.5M NaClを用いる勾配プログラムを、1.5mL/minの流量で使用した。問題の生成物は、競合 ELISA法で測定する場合、各々3~4分間カラムから放出させた。この時点の画分の、二つの SDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクーマシーブリアン

トブルーR250で染色し、他方のゲルはウェスタン分析 (ブローブ抗体としてビオチニル化 PAID 14を使用) に移されたが、scFv2(LHLHまたはLHHL) の種の計算分子量の単一バンドが、58,238ダルトンの位置に出現した。活性画分は各場合濃縮し、50mM MES pH 5.8に対して一夜透析し、次いで Pharmacia社の Mono S HR 5/5 カチオン交換カラムに注射した。この精製ステップからの問題の二つの画分の5と8は、SDS-PAGE法およびELISA法で測定する場合、勾配液の使用が開始される直前に溶出された。したがってこれらの画分は実際にはカラムに結合していなかったわけである。次いで画分5と6はさらに精製するためにブールした。

Mono Qカラムを活性Mono S画分について再度使用したが使用した緩衝液は20mMトリス-HCl pH 8.0であり、流量は0.8mL/分に低下させた。生成物はカラムとの結合なしで放出されたが、Mono Sに残っている不純物がわずかにあり、したがって分離は5~6分間であった。この処理を行った後、生成物は均質であり以後の特性決定のために貯蔵した。

#### 等電点電気泳動

精製物の等電点 (pI) は DNASTAR社 (米国、ウィスコンシン州、マディソン所在) のコンピュータプログラム Protein-literateを使用して予測した。アミノ酸組成、MWおよびpI値に基づいて計算した。

試験では、pIは、PMC Bioproducts社 (米国、メーン州、ロックランド所在) の Isogel IEPプレート pH範囲3~10を使用して測定した。上記IEPを操作するために、Biorad社 (米国、カリフォルニア州、リッチモンド所在) の電気泳動装置を、上記両メーカーの指示にしたがって使用した。その電気泳動の条件は、20mAで500V (限定) および一定電力の10Wであった。等電点電気泳動は90分間で完了した。Biorad社の IEP標準品は、フィコシアニン、βラクトグロ

ブリンB、ウシカルボニックアンヒドラーゼ、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ、ウマミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のヒラマメレクチンおよびシトクロムCが含有され、pI値はそれぞれ4.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.50, 7.8, 8.00, 8.20 および9.6であった。ゲルはPMCの指示にしたがって染色し脱色した。DNASTAR プログラムによって両方の scFv2の種のpI値として8.1の値が予測された。純品の生成物に対し単一の均一なバンドがゲル上に、両者のpI値の8.8の位置にみとめられた。

IgG, scFv2 (LHLHおよびLHHL) のような精製CC49抗体は、280nm波長光の吸光度を分光光学的に測定することによって定量した。モル吸光係数値E<sub>m</sub>は各々、先に引用した Wetliawferの式を用いて測定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、CC49IgG, CC49scFv2LHLH, CC49scFv2LHHLおよびCC49scFvのE<sub>m</sub><sup>280nm</sup> (280nm)値はそれぞれ1.49, 1.65, 1.65および1.71であった。

#### 実施例4

CC49scFv2の種のLHLHとLHHLの相対活性を、IgGおよびCOOH末端にFLAGペプチドを有する単量体scFv型と比較した。

パーセント競合 (percent competition) を下記式によって ELISAのデータから求めた。

$$\frac{\text{ゼロ競合}-\text{試料競取り値 (OD 405-450nm)}}{\text{ゼロ競合}-100\% \text{競合}} \times 100$$

"ゼロ競合 (zero competition)" 値は、1% BSAをビオチニル化 CC49 (3×10<sup>-14</sup>モル) と1:1比率で混合して測定し、一方100%競合値はビオチニル化 CC49IgGと混合した CC49IgGの5μg/mL試料に基づいた値である。これらのデータは図11に示す。試料の吸光度値は405nm~450nmで測定した。3回の試取値の平均値を使

用した。最初に試料 (25μL) を、TAG-72でコートしたマイクロリットルプレートに、1.0×10<sup>10</sup> モルの結合部位/mLで塗布した。ビオチニル化CC49 (4μg/μL) : 20,000に希釈、25μL使用) で試料を1/2濃度に希釈した。連続希釈法 (1:2) を行った。両方の形態の scFv2はIgGにほぼ等しい (図11参照)。別の試験で、CC49scFv単量体を Fabフラグメントと比較した。両者は一価であるが、これらはTAG-72に対する結合アフィニティーが等しいことを示した。これらの結果は、共有結合の二量体の両者の形態は、二つの充分に機能的な抗原結合部位をもっていることを示している。これは、単量体の種に比べて全IgGについてみられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、scFv2分子が、そのCC49IgGの種と同様に、免疫治療用途の候補であり、毛細血管透過性の増大および迅速な生体分布薬物動態の利点を有することを示している。この利点によって、既存のIgG分子に比べて、本発明の化合物は多数回注射することができ、かつ癌治療に用いる免疫治療法において腫瘍組織比を高くすることができる。

本発明の他の実施態様は、本明細書を検討するかまたは本願に開示されている発明を実施することから、当該技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施例は例示だけを目的とするもので、本発明の真の適用範囲と思想は以下の特許請求の範囲によって示される。

以上

FIG. 2

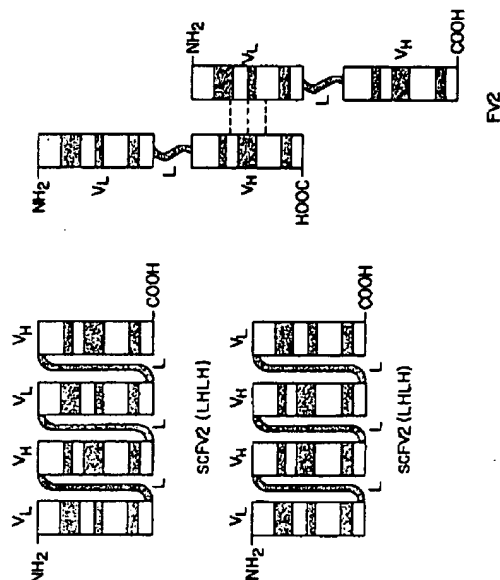
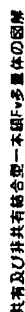
[illegible]

FIG. 3

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val  
Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Lys  
Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Thr Ala Trp Tyr Gln Gln Leu  
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg  
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala  
Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly  
Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys

FIG. 4

GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT  
GGG GCT TCA GTG CAG ATT TCT TGC AAG GCT TCT GGC TAT ACC  
TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG CCT GAA  
CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT  
GAT TTT AAA TAC AAT AAG AGC TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTC  
ACT CCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCC TAC CCG GAG CTC AAC  
AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA  
TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC  
TGC TTC TCA

FIG. 5

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Asp	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly
Asp	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr
Asp	His	Ala	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Asn	Pro	Glu	Gln	Phe	Leu
Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Phe	Ser	Pro	Gly	Asn	Asp	Asp	Phe	Lys	Tyr
Asn	Glu	Arg	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser
Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Val	Gln	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp
Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Thr	Arg	Ser	Leu	Asn	Met	Ala	Tyr	Trp
Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser					

特許(内容に変更なし)

**FIGURE 6**

CCAG W-L-VL-VHCDNAJVP三ノ酸配列

[illegible]

FIG. 6D

[illegible]

FIG. 6E

330	Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp AAA CTG CTG ATT TAC TCG GCA TCC GCT ACG GAA TCT GGG CTC CCT GAT	1390
340		
350	Arg Phe Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser CCC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC ACC	1438
370		
380	Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr Trp Cys Glu Glu Tyr Tyr AGT CTG AAG ACT GAA GAC CTC GCA GTT TAT TAC TTT CAG CAG TAT TAT	1486
390	Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Leu AGC TAT CCC CTC ACC TTC GCT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTG AAG GTA	1534
400		
410	Pro47 III Ser47 Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Asp Asp Ala Lys ACC GCT GAT GAT GAT GCT AAG AAG GAG GCG GCA Ala AAG GAC GAC GCA Ala	1582
420		
430	Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Glu Val Glu Leu Glu Ser Asp AAG CAT GAT GCA AAA AAG GAT CTC GAG GTT CAG TTC CAG CAG TCT GAC	1630
440		
450	Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala GCT GAG TTG GTG AAA CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATT TCT TCC AAG GCT	1678

FIG. 6B

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Irr	526
TGG	TAC	CAG	CAG	AAA	CCA	GGG	CAG	TCT	CCT	AAA	CTG	CTG	ATT	TAC	TGG	
50																
Ala	Ser	Ala	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	70
GCA	TGC	GCT	ACG	GAA	TCT	GGG	GTC	CCT	GAT	CGC	TTC	ACA	GGC	AGT	GGA	
80																
Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Ser	Val	Lys	Thr	Gln	Asp	
TCT	GGG	ACA	GAT	ATC	CTC	TCC	ATC	AGC	AGT	GTG	AAG	ACT	GAA	GAC		
90																
Leu	Ala	Val	Tyr	Irr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	
CTC	GCA	GTT	TAT	TAC	TGT	CAG	CAG	TAT	TAT	AGC	TAT	CCC	CTC	ACG	TTC	
100																
Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Leu	Lys	Leu	Ser	Ala	Asp	Asp	Ala	Lys		120
GGT	GCT	GGG	ACC	AAG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	
Blind 117																
130																
Lys	Asp	Ala	Ala	Lys	Lys	Asp	Asp	Ala	Lys	Lys	Asp	Asp	Ala	Lys	Lys	
AAG	GAT	GCT	GGC	AAG	AAG	GAT	GAC	GCT	AAG	AAA	GAC	GAT	GCT	AAA	AAG	766

FIG. 6C

106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

抄寫(内容に変更なし)

FIGURE 7

CC49 VL-L-VH-L-VH-L-MのDNA及びアミノ酸配列

5'-C TCA TGT TTG ACA GCT TAT CAT CGA TGA ATT CCA TCA TCA CTT CCC TCC 46  
GTT CAT TTG TCC CCG GTG GAA ACG AGG TCA TCA TTT CTT TCC GAA AAA 94  
ACG GTT GCA TTT AAA TCT TAC ATA TAT ACT TTC TTT AAA GAC TAC ATT 142  
TGT AAC ATT TCA TGT TTG AGT CCG CTG AAA GAT CCG TAC CAA TTA 190  
TTG TTT CTT CAT TGT TCA ACG CAT AAC ACT GTA GCG ATA GTG GAA 238  
GTG CTT CAT CTG GTT ACG ATC AAT CAA ATA TTC AAA CCG ACG GAG ACG 286  
PENP82- TAT AAG TTT CCC TTC CTC TG  
-22  
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu  
ATT TTG ATG AAA TAC CTA TTG CTT CCG CCA GCG GCT GGA TTG TTA TTA 334  
VL  
Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro  
CTC GCT GCG CAA CCA GCG ATG GCG GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA 382  
Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys  
TGC TCG CTA CCT GTG TCA GTT GCG GAG AAG GTT ACT TTG ACG TCG AAG 430

FIG. 7B

Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala 40  
TCC AGT CAG ACG CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC 478  
Tyr Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp  
TGC TAC CAG CAG CAA CCA GCG CAG TCT CTT CCA CTC CTG ATT TAC TGG 526  
Ala Ser Ala Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly  
GCA TCC GCT AAG GAA TCT CCG GTC CTT GAT CCG TTC ACA GCG AGT GCA 574  
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Gln Asp  
TCT GCG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG AAG ACT GAA CAC 622  
Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Cln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe  
CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT ACG TAT CCC CTC ACG TTC 670  
Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Ser Ala Asp Asp Ala Lys  
GGT GCT CCG ACC AAG CTG GTG CAG CTT AGT GCG GAC GAT CCG AAA 718  
Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys 130  
AAG CAT CTT CCG AAG AAG CAT CAC GCT AAG AAA GAC CAT CTT AAA AAG  
TTC CTA CCA CCG TTC TTC CTA TGGVL(-)JSDQ

FIG. 6F

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn 1726  
TCT GCG TAC ACC TTC ACT CAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC  
360 370  
Pro Gln Gln Gly Leu Gln Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp 1774  
CCT GAA CAG GCG CTG CAA TGG ATT GCA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT  
480  
Asp Phe Lys Tyr Asn Gln Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala 1822  
GAT TTT AAA TAC AAT GAG AGG TTC AAG GCG AAC GCG ACA CTG ACT GCA  
490 500  
Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser 1870  
GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCG TAC GTG CAG CTC AAC AGC CTG ACA TCT  
510 520  
Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr  
GAC CAT TCT CCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GCG TAC  
530  
Tyr Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser \*\*\* Nhe I  
TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA TAA AAA GCT AGC GAT 1966

FIG. 6G

GAA TCC GTC AAA ACA TCA TCT TAC ATA AAG TCA CTT GGT GAT CAA GCT 2014  
SQP1- TGT AGT ACA ATG TAT TTC AGT  
PENP15Q2- G TAT TTC ACT GAA CCA CTA GTT  
CAT ATC ATT GTC CCG CAA TGG TGT GCG CTT TTT TTG TTT TCT ATC TTT 2062  
AAA GAT CAT GTG AAG AAA AAC GCG AAA ATC GGT CTG CCG GAA AGG ACC 2110  
CGG TTT TTG TCG AAA TCA TAG CCG AAT GCG TTG GAT TGT GAC AAA ATT 2158  
BamH I  
CGG ATC C-3' 2165

FIG. 7C

380 Ser Leu Asp Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gln Thr Ser Val Thr Val Ser  
TCC GTG AAT ATG GGC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC 1534

390 Xho I 140  
Asp Leu Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Val Lys Pro  
GAC CTC CAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT 818

400 Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
GGG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TCG AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACT 862

410 Phe His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gln Gln Gly Leu Gln  
GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC CCT GAA CAG GGC CTG GAA 910

420 Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Phe Lys Tyr Asn Gln  
TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCG GGA AAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG 958

430 Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr  
AGG TTC AAG GGC AAG GGC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT 1006

440 Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Gln Asp Ser Ala Val Tyr  
GCC TAC GTG CAG CTC AAC AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT 1054

450 Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gln Thr Ser  
TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GCG TAC TCG GGT CAA GCA ACC TCA 1102

FIG. 7E

380 Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gln Thr Ser Val Thr Val Ser  
TCC GTG AAT ATG GGC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC 1534

390 Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Lys Lys Asp Asp  
TCA CTA ACC CCA CAT GAC CCA AAG AAA GAG CCA GCT AAA AAA GAG GAT 1582

400 Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Asp Ile Val Met Ser Gln  
GGC AAA AAG CAT GAC GGC AAG AAA CAT CTT GAC ATT GTG ATG TCA CAG 1630

410 Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Leu Ser  
TCT CCA TCC TCC CTA CTT GTG TCA GTT GCG GAG AAG GTT ACT TTG ACC 1678

420 Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr  
TCC AAG TCC ACT CAG ACC CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC 1726

430 Leu Ala Trp Tyr Trp Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Ile  
AAC CCG ACC ATG GTC CTC 1774

440 Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
TAC TCG CCA TCC GCT ACC GAA TCT GGG GTC GCT GAT CCG TTC ACA GGC 1822

FIG. 7D

250 Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala  
GTC ACC GTC TCC TCA CTA AGC GCA CAT GAC AAA GAG GCA GCT 1150

260 Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Gln Val  
AAA AAA GAC CAT GCG AAA AAG GAT GAC GCG AAG AAA GAT CTT GAG GTT 1198

270 Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val  
CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCG GGT TCA GTG 1246

280 Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile  
AAG ATT TCC TCC AAG GCT TCT GCG TAC ACC TTC ACT GAC CAT CCA ATT 1294

290 His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gln Gln Gly Leu Gln Tyr Ile Gly Tyr  
CAG TCG GTG AAA CAG AAC CCG GAT GAG GCG CTG GAA TCG ATT GGA TAT 1342

300 Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Gln Arg Phe Lys Gly  
TTT TCT CCG CCA AAT CAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG ACG TTC AAG GGC 1390

310 Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Val Gln  
AAG CCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCG TAC GTG CAG 1438

320 Leu Asn Ser Leu Thr Ser Gln Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg  
CTC AAC ACC CTC ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA 1486

FIG. 7F

490 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr  
ACT GCA TCT GCG ACA CAT TTC ACT CTC TCC ATC ACC AGT GTG AAG ACT 1870

500 Gln Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu  
GAA GAC CTC GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCG CTC 1918

510 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Ser  
ACG TTC GGT GCT GCG ACC AAG CTG GTG CTT AAG TAA AAA GCT AGC GAT 1966

520 GAA TCC GTC AAA ACA TCA TCT TAC ATA AAG TCA CTT GGT GAT CAA GCT  
530 50PT- TGT APT AGA ATG TAT TTC AGT GAA CCA CTA GTT 2014

540 CAT ATC ATT GTC CCG CAA TCG TGT GCG GTT TTT TTG TTT TCT ATC TTT 2062

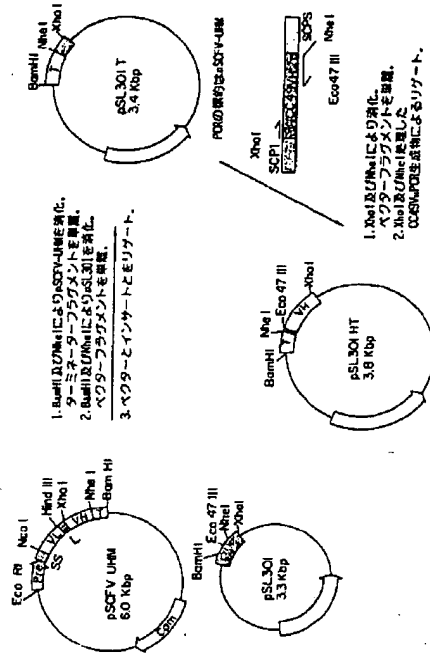
550 AAA GAT CAT GTG AAG AAA AAC GCG AAA ATC GGT CTG CCG GAA AAG ACC 2110

560 CCG TTT TTG TCG AAA TCA TAG CCG AAT CCG TTG GAT TGT GAC AAA ATT 2158

570 BamHI I  
CGC ATC C-3' 2165

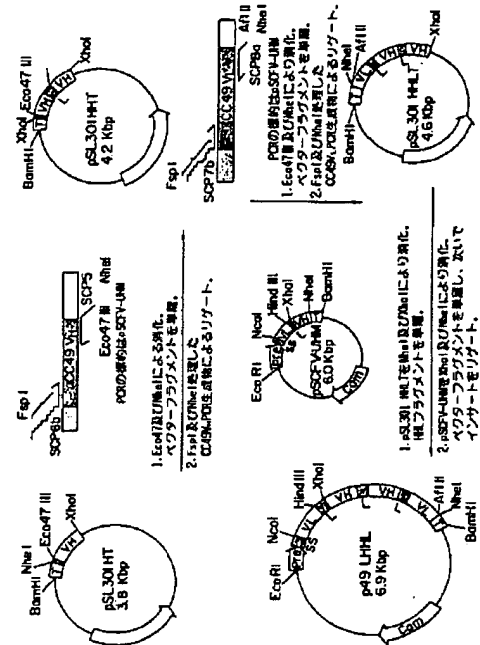
特許(内容に変更なし)

FIGURE 8



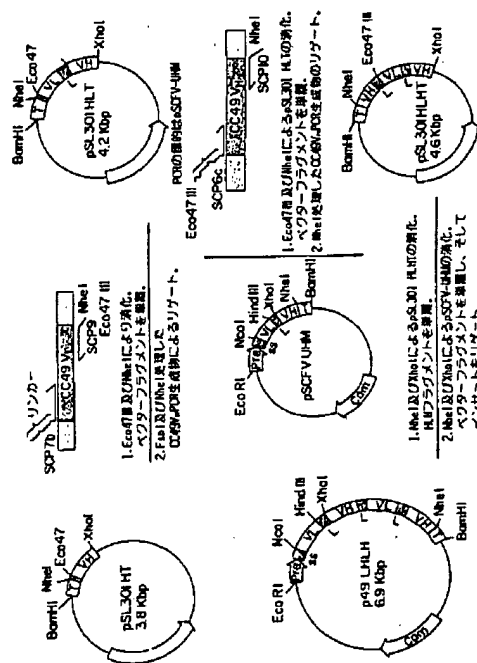
特許(内容に変更なし)

FIGURE 9



特許(内容に変更なし)

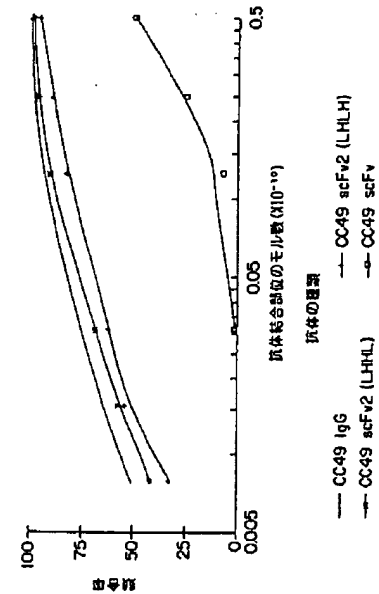
FIGURE 10



特許(内容に変更なし)

FIGURE 11

CC49 IgG, SCFv2 & SCFv2の結合アッセイ  
結合因子: ビオチニル化CC49 IgG



平成6年 9月1日

特許庁長官 高 島 章 図

1. 事件の表示  
PCT/US93/12039
2. 発明の名称  
多価の一本鎖抗体
3. 補正をする者  
事件との関係 特許出願人  
名称 ザ ダウ ケミカル カンパニー

4. 代理人  
住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル  
青和特許法律事務所 電話 3504-0721  
氏名 弁理士(7751) 石田 敏

5. 補正命令の日付  
自発補正
6. 補正の対象
- (1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文
  - (2) 図面の翻訳文
  - (3) 委任状
7. 補正の内容
- (1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文の浄書（内容に変更なし）
  - (2) 図面の翻訳文の浄書（内容に変更なし）
  - (3) 料紙の通り



## 5. 染劑在報告

Image of Applicant's ID  
PCT/US 93/12039

IFC 5 C12H 007H/28 C12H18/52 A61X39/395 (Classification by TUBREY SYSTEM)		70105 03/12/84
ADDRESS to International Patent Classification (IPC) of IN 1989 general classification and CPC		
B. FIELD'S SEARCHES (Classification system followed by classification system)		
IPC 5 C12H 007H		
Comments entered after the automatic classification to the effect that such documents are omitted at the field's request		
(Documents that have occurred during the international search phase of this field and, where permitted, search logs)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Details of document, with reference, where appropriate, of the abstract paragraph	Entered in class No.
X	WO, A, 91 19739 (CELTECH LIMITED) 26 December 1991 see example 1	1,5
Y	—	2-4,6
Y	CANCER RESEARCH vol. 52, no. 12, 15 June 1992 . PHILADELPHIA, PA, USA pages 3422 - 3408 T.VOKATA ET AL. "Rapid tumour penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms" see page 3403, column 1, paragraph 4	1,6
-/-		
D. Further documents not listed in the classification of this C.		
E. Field's search criteria are listed in search		
F. Special categories of cited documents :		
*A	Document identified by patent date of the art which is not considered to be of particular relevance	*B
*C	Where document not published on or after the international filing date	*D
*E	Document which may have relevance as primary document or as a source of information for the prior art of the invention	*F
*G	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*H
*I	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*J
*K	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*L
*M	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*N
*O	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*P
*Q	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*R
*S	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*T
*U	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*V
*W	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*X
*Y	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*Z
*AA	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*AB
*AC	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*AD
*AE	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*AF
*AG	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*AH
*AI	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*AJ
*AK	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*AL
*AM	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*AN
*AO	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*AP
*AQ	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*AR
*AS	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*AT
*AU	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*AV
*AW	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*AX
*AY	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*AZ
*BA	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*BB
*BC	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*BD
*BE	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*BF
*BG	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*BH
*BI	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*BJ
*BK	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*BL
*BM	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*BN
*BO	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*BP
*BQ	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*BR
*BS	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*BT
*BU	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*BV
*BW	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*BX
*BY	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*BZ
*CA	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*CB
*CC	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*CD
*CE	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*CF
*CG	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*CH
*CI	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*CJ
*CK	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*CL
*CM	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*CN
*CO	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*CP
*CQ	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*CR
*CS	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*CT
*CU	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*CV
*CV	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*CW
*CX	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*CY
*CY	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*CZ
*DA	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DB
*DC	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DD
*DE	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DE
*DF	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DF
*DG	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DG
*DH	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DH
*DI	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DI
*DJ	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DJ
*DK	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DK
*DL	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DL
*DM	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DM
*DN	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DN
*DO	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DO
*DP	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DP
*DQ	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DQ
*DR	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DR
*DS	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DS
*DT	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DT
*DU	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DU
*DV	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DV
*DW	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DW
*DX	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DX
*DY	Document which may have relevance as a source of information for the prior art of the invention	*DY
*EZ		

國 際 調 查 報 告

PCT/US 93/12039

S/Classification (FOUO/INT) CONTAINED HEREIN IS UNCLASSIFIED		FOUO/INT 2000 120003	
Category	Change of category, not substance, where appropriate, of its relevant passage	Relevant to class 100	
V	<p>SICCHENHISTAY vol. 30, no. 42, 22 October 1991, EASTON, PA 05 pages 10137 - 10125 M.N. PANTOLIANO ET AL. 'Conformational stability, folding and ligand-binding affinity of single-chain Fr immunoglobulin fragments expressed in Escherichia coli' cited in the application see page 10120, column 1, paragraph 2</p>	2, 4	
X	<p>EP, A, 0 506 124 (TANOK BIOSYSTEMS, INC.) 30 September 1992 see example 6</p>	1, 5	
P, X	<p>WO, A, 93 11161 (EMCON, INC.) 10 June 1993 see figure 19A</p>	1, 3-6	

1999-2000

page 2 of 2

■ 康 調 查 報 告

Name: PCT/US 93/LE03H	Application No.: 93/000000
--------------------------	-------------------------------

Private documents used in search report		Publication date		Private family numbers		Publication date	
WO-A-9119739	84-12-81	AU-A- DE-A- GB-A- JP-T-	79A3191 0486652 2250999 6602039	07-01-92 27-05-92 24-06-92 18-04-93			
EP-A-0506124	90-09-02	AU-B- AU-A- JP-A-	640843 1292282 5137164	02-09-93 18-10-92 14-05-93			
WO-A-9311163	10-06-93	AU-A-	3178968	28-08-93			

**FROM LEFT TO RIGHT: A MONTANA HORSE RACING AND MEETING**



フロントページの続き

(51) Int. Cl. *	識別記号	庁内整理番号	F I
C 0 7 K 18/46		8318 -4H	
C 1 2 N 15/09	Z N A		
//(C 1 2 P 21/08			
C 1 2 R 1:19)			

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)1月13日

【公表番号】特表平7-503622

【公表日】平成7年(1995)4月20日

【年通号数】

【出願番号】特願平6-514437

【国際特許分類第6版】

C12P 21/08

C07K 16/00

16/18

16/32

16/46

C12N 15/09 ZNA

//(C12P 21/08

C12R 1:19 )

【F I】

C12P 21/08 9358-4B

C07K 16/00 9356-4H

16/18 9356-4H

16/32 9356-4H

16/46 9356-4H

C12N 15/00 ZNA A 9282-4B

手 続 補 正 書

平成9年7月2日

明 細 書

多価の一本鎖抗体

特許庁長官 茂 井 秀 光 君

1. 事件の要旨

平成6年特許第511437号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ザ グロ ケミカル カンパニー

3. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル

青和特許法律事務所 電話 03-5470-1930

氏名 弁護士(7751) 石 世 敬

4. 補正対象書類名

明細書及び請求の範囲

5. 補正対象項目名

明細書及び請求の範囲

6. 補正の内容

- (1) 明細書を明細の通り補正します。  
(2) 請求の範囲を明細の通り補正します。

7. 添付書類の目録

- (1) 明 細 書 1 冊  
(2) 特 許 範 疇 1 冊



本発明は一本鎖の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質に応じて免疫系により生成されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は4鎖体、又はその集合体であり、軽鎖と重鎖とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。鎖は一本の可変(V)ドメインと一本の定常(C)ドメインとより成り、他方、重鎖は一本の可変性ドメインと、3本以上の定常ドメインとより成る。軽鎖及び重鎖の両者に由来する、それぞれV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>と称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特異性を決定し、他方、定常(C)ドメインは増々なエフェクター機能をもたらす。

アミノ酸配列データベースは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的高保存されたフレームワーク領域(FR)によりフラグメントされている3つの構造的決定領域(CDR)を含んで成ることを示唆する。このFRは可変領域ドメインの構造依拠性を維持するものと考えられている。この CDRは個々の抗体の結合特異性にとって重要であり、4つの抗体の結合の特異性の原因であると想定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、IgGクラスは2つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五量体 IgMクラスは10の同一の結合部位を有している。

同一の遺伝子系列及び結合特異性を有するモノクローナル抗体は腫瘍及び治療剤の開発者として重要とされている。モノクローナル抗体は、遺伝された手順に従い、マウスのリンパ球と適当なマウスミエローマ細胞系との融合により作られたハイブリドーマにより生産的に製造される。しかしながら、ヒトにおけるインビボ治療及び診断にとってのニーズは抗体の数は、ヒト免疫系により誘発されるとヒト-マウス抗体反応に基づき制約されている。

モノクローナル抗体であって、一の能に由来する抗体の場合又は可変領域が切の能に出

ある抗原の定常濃度と結合されたものが抗原 363万法により作られている。  
例えば、Shigeta et al., J. Immunol., 137: 1066-1074 (1986) ; Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214-218 (1985) ; Nishimura et al., Cancer Res., 47: 999-1005 (1987) ; 及び Lie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 3439-3443 (1987) を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を提示している。典型的には、キメラ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはキメラ抗体よりも免疫原性が質的に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その動態動力学に影響を及ぼすタンパク質構造体のうちの主要部分を構成する7c領域を含有し隠れている。免疫療法又は免疫診断における抗体の利用のため、腫瘍組織に迅速に集積し、且つ結合する抗体分子を待てること、及び未結合の抗体が身体から迅速に排除されることが所望される。一般に、小さな抗体フラグメントは局所の毛管透過性を有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く排除される。

抗原と相互作用するのは移動及び運動の可変領域であるため、一本のV<sub>H</sub>と一本のV<sub>L</sub>とにより一本鎖抗体フラグメント(scFv)が作られており、これら二つのC<sub>H</sub>を含み、それらはペプチドリンカー(米国特許第4,816,775号)により連結されたV<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>をペプチドで成しており、ここでLはペプチドリンカーを表している。V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインが互向V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>であるscFvが図4の特許第5,132,465号に開示されている。

完全抗体としての最少限の二つの結合部位と比べてscFvは一つのそれを有するため、scFvは2以上の結合部位を含む抗体に比べて良い特性を有している。

従って、このポリペプチドの特性を高めるため、両方の抗原認識特性を保持又は高めるため、複数の結合部位を有するscFvの構築を導導することが有利であろう。加えて、鎖状組織上の別々のエピトープの認識を可能とする、別の免疫ニフター観望の抗体ベース結構を可能とする、又はホストもしくは診断成分の抗体検査を可能とする二価特異的である多価scFvを構築することが有利であろう。

それぞれ第一ペプチドリンカーにより共有結合している一本のV<sub>H</sub>と一本のV<sub>L</sub>

ドメインとを有する一本鎖抗体フラグメントは、第二ペプチドリンカーによって対向結合されて、完全抗体の結合能力を維持している多価一本鎖抗体を形成できることが発見された。一態様において、本発明は抗原に対する親和性を有する多価一本鎖抗体であり、ここでこの多価一本鎖抗体は2本以上の可変ドメインと2本以上の常価ドメインとを含んで成り、ここで各可変ドメインは少なくとももう一つの別の可変ドメインに連結されている。

別の態様において、本発明は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成る多価一本鎖抗体であり、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

- (a) 親和性ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；
- (b) 親和性ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；

を含んで成る。  
別の態様において、本発明は、多価一本鎖抗体をコードするDNA配列を発生し、ここでこの多価一本鎖抗体は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

- (a) 親和性ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；
- (b) 親和性ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；

を含んで成る。  
この多価一本鎖抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいても小さく、より迅速な毛管透過を可能とする抗体フラグメントの構築を可能とする。多価一本鎖抗体は、結合部位が複数の抗原決定基であらう多価一本鎖抗体の構築も可能とせらる。

#### 図4の構造図解

図1は、V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>H</sub> (L<sub>H</sub>L<sub>L</sub>) と V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> (L<sub>H</sub>L<sub>L</sub>) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体及び非共有結合型二一本鎖抗体(Fv2)を示す。

図2は CC49V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 1) のヌクレオチド配列を示す。

図3は CC49V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 2) のアミノ酸配列を示す。

図4は CC49V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 3) のヌクレオチド配列を示す。

図5は CC49V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列を示す。

図6は p49LHLL (SEQ ID NO: 6) におけるCC49一本鎖抗体LHLLのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図7は p49LHLL (SEQ ID NO: 8) におけるCC49一本鎖抗体LHLLのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図8はプラスミド pSL3017及びpSL3018Tの構造を示す。

図9はプラスミド p49LHLLの構造を示す。

図10はプラスミド p49LHLLの構造を示す。

図11はCC49IgG、CC49scFv2及びCC49scFvを用いた、融合因子としてデオキシリボ糖ニグロシを阻害する融合アッセイの結果を示す。

本明細書で添付した全ての文献の教示全体を引用することによって本明細書に記入される。

抗原、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基等を略すとき、それらはIMBAC 100 (Commission on Biochemical Nomenclature) 又は関連分野の専門に依って略している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」(scFv)又は「抗体フラグメント」なる語は、V<sub>H</sub>とL<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>とL<sub>L</sub>により成られる、ペプチドリンカー(L)によりV<sub>H</sub>ドメインに連結されたV<sub>L</sub>ドメインを含むポリペプチドを意味する。V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインとの順序は逆であってよく、V<sub>L</sub>とL<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>として表わされるポリペプチドが普通であろう。「ドメイン」は、独立の領域、例えば抗原結合又は抗原認識を及ぼすタンパク質のセグメントである。

「多価一本鎖抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した2以上の一本鎖抗体

体フラグメントを意味する。この抗体フラグメントは連結されて、

V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub> ; 又は  
V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub> ;

のV<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインの順序を有する二価の一本鎖抗体を形成してよい。

三価以上の一本鎖の多価抗体は、追加のペプチドリンカーによって二価の一本鎖抗体に連結された1又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な態様においては、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインの数は等しい。

本発明は、

V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub> ; 又は V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub> ;

で表示される多価の一本鎖抗体を提供する。

V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub> (L<sub>H</sub>L<sub>L</sub>) ; 及び V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub> (L<sub>H</sub>L<sub>L</sub>) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体を図1に示す。非共有結合型二一本鎖抗体(Fv2)も図1に示している。

本発明において利用するための一本鎖抗体フラグメントは任意の抗体の骨格及び/又は可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その骨格と可変ドメインは同一の抗原に特異的である。選択されて多価の一本鎖抗体を構築している個々の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的であらうか、又は別々の抗原に対して特異的であらう。

一本鎖の多価抗体についてのDNA配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする遺伝子の構築が必要とされる。適当なDNA配列は公共の記録から入手するか、又は当業界に公知の標準の手段によって獲得できる。例えば、The U.S. Department of Health and Human Servicesにより公開された RabbitのSequences of Proteins of Immunological Interest 第4版(1991)は、今日まで述べられているほとんどの抗体可変領域の配列を提示している。

遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローニングするDNAの断片として、遺伝子ライブラリー合成によりmRNAから獲得したcDNA配列を利用することが一般に可能である。抗体に依りて、mRNAの起源は抗原にわたるハイブリドーマから獲得できる。例えば、カクログATCC Cell Lines and Hybrids, American Type Cu

Libra Collection, 20350 Parklawn Drive, Rockville Md., USA (1999) を参照のこと。その中に挙げられている幅広い様々な抗原と反応性のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、そして本発明において利用できる。これらの群内系及びその他の産物の複雑さが、抗原ドメインをコードするmRNAの転写として、又はモノクローナル抗体と体のアミノ酸配列を決定するために抗体タンパク質を産出するように利用できよう。

抗体の免疫原性は、適当な寄与断片、通常は抗原断片を最も好都合にはマウスを免疫することにより得られる。その免疫原は抗原の抗原であるか、又はバプタンであるか、キーホールリンペットヘンシアニン(KLH)の如きの抗原に対するこのバプタンの抗原後抗体である。免疫化は宿主哺乳動物への通常は2〜3週間隔きの免疫の1又は2回の繰り返し注射によって行われ得る。通常、最後の免疫の3日後、脾臓を取り出し、そして細胞が培養中に公知の標準手順により簡単に獲得できるようにハイブリドーマを形成するための細胞融合に利用する単細胞懸液と溶解する。

抗原の抗体が獲得でき、そしてモノクローナル細胞配列だけを知り得たら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用なV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインは好ましくは、1990年3月3日に公開されたPCT出願90/06/04410及び1989年1月26日に公開されたPCT出願90/09/0932に開示されている、免疫調節タンパク質72抗原に対する2種のCC抗体の一つから取得である。より好ましいのは、PCT出願90/04410及び90/09/0932においてCC49と表示されているモノクローナル抗体に由来するV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインである。CC49のV<sub>H</sub>をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 1)は図2に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>L</sub>のV<sub>H</sub>ノド配列(SEQ ID NO: 2)は図3に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>H</sub>をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 3)は図4に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>L</sub>をコードするアミノ酸配列(SEQ ID NO: 4)は図5に示すものと実質的に同じである。

本発明の抗体フラグメント及び多価の一本鎖抗体を形成するため、適当なペプチドリンカーを得ることが必要である。V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインを連結するための適

当なリンカーは、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインが、一本鎖ポリペプチドで完全に結合したものと構造に非常に類似する三次元構造を有し、従ってその抗体フラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持しているポリペプチド鎖へと折りたたまれることを可能にするものである。scFvを連結するための適当なリンカーは、各イムノグロブリンフラグメントのV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインが三次元構造で、その各フラグメントが、そのイムノグロブリンフラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持するような三次構造を有するように、2以上のcys残基を連結することの可能なものである。所望の特性を有するリンカーは、その鎖が両端を引用することで本明細書に記入される本開示第4,646,776号に開示の方法により獲得できよう。この第4,646,776号に記載の方法により作成されたポリペプチド配列より、ポリペプチドをコードする遺伝子配列が獲得できよう。

好ましくは、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインを連結してscFvを形成せしめるペプチドリンカーと、2以上のscFvを連結して多価の一本鎖抗体を形成せしめるペプチドリンカーとは実質的に同じアミノ酸配列を有する。

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その両方の抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗原認識部位の結合能力を妨げないように追加されていることも必要である。

好適なリンカーは、PartaliansらのBiochem. J. 261: 1017-1025(1991)に開示されている255と称されているヘリカルリンカーを基礎とすが、その最末と最後のアミノ酸は、一端にあるIso189位と、他端にあるHindIII部位により指定されるコドンで理由に置き換えられている。

好適なリンカーのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 5)は下記の通りである：

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Lys Asp Lys

このリンカーは一般に10〜30のアミノ酸残基である。好ましくは、このリンカーは10〜30のアミノ酸残基である。より好ましくは、このリンカーは12〜30のアミノ酸残基である。最も好ましくは、このリンカーは15〜25のアミノ酸残基である。

本発明の分子の製造のための発現媒体にはプラスミド又はその他のベクターが

含まれる。一般に、かかるベクターは宿主細胞と適合性な産物に由来するレプリコンとコントロール配列を含む。このベクターは通常レプリコン原性、及び形質転換細胞の中で最も頻りに提供することのできる特定の遺伝子を保持している。例えば、人間遺伝子(Bcl1) (pBR322を用いて容易に形質転換される) (Bollivar, Gene, 2, 95- (1977)又はSuckrecker, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York 第2版 (1989) ]。

真核細胞にとって適当なプラスミドも利用できよう。S. セレビス (S. cerevisiae) 又は一部のパン酵母が真核生物の中で最も一般的に利用されているが、数多くのその他の例、例えばバシラ・パストリス (Bacillus pastoris) が有用である。多細胞動物、例えばATCCより入手できるSP2/0又はチャイニーズハムスター卵巣に由来する細胞の培養物も宿主として利用できよう。哺乳動物細胞にとって適当な典型的なベクタープラスミドはpSV2neo及びpSV2SP1(ATCC) : pSV1及びpSV5neo (Pharmacia), pBPV-1/pML24 (International Biotechnology, Inc.) である。

本発明のポリペプチドについての遺伝子を免疫するための抗体及び抗体シミュラス抗原ベクターの利用も考慮される。

この免疫ベクター及びこの一本鎖の多価抗体をコードするインサートは、その挿入部位において適合性制限部位を有し、且つその制限部位が挿入の領域によって固有であることが好ましい。ベクター及びインサートの両方とも制限エンドヌクレアーゼにより処理し、次いで任意の様々な方法、例えばSambrookら、記載に記載の方法によりリゲートする。

本発明の一本鎖の多価抗体の製造によって好適なベクターの遺伝子構築物は、構成的に応答性転写プロモーター、動生一本鎖ポリペプチドの合成/分泌の外への分泌を誘導するシグナルペプチドをエンコードする領域を含むものである。好ましくは、その免疫原性は、不溶性物質としてそのポリペプチドが蓄積することを避けるために最適、折りたたみ及び無活性型とつり合う。レプリコン及びコントロール配列に加えて、一本鎖ポリペプチドの製造に合成によって適当の要素が必要とされる。これらの要素にはスプライシング、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが含まれる。更に、追加の遺伝子及びその

中成物が実用及び折りたたみを助長するために必要とされる(シグナル)。

用取られているベクターはベクターにとって上記の基準を満たすように簡単に改造される。かかる改造は入手できる書物及び本明細書における教示により、当業者によって容易に実施される。

更に、このクローニングベクターは選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカー、又は宿主細胞による選択できる特徴の発現を引き起こすその他のマーカーを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、細胞融合技術を用いて構築されたベクターにより細胞内に形質転換される細胞である。薬剤耐性又はその他の選択マーカーは形質転換の選択を容易に助長することを意図する。更に、選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカーの存在は、発現細胞が培養場の中で繁殖することを防ぐうえで利用される。この意味において、かかる特許な形質転換細胞の培養物は生体のために導入された変異型を必要とする条件のもとで細胞を培養することにより得られるであろう。

本発明の抗体及び構築物は培養中に公知の標準操作を利用して達成される。例えば、もしそれらが培養培地の中に分泌されるなら、この一本鎖の多価抗体は限外濾過により濃縮される。そのポリペプチドが宿主細胞のペリプラズマ空間へと輸送されるなら、培養はその細胞に浸透圧ショックを与え、次いで限外濾過、抗原アフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いるカラムクロマトグラフィー及びゲル濾過を実行することにより濃縮される。不溶性であり、且つ屈折体(refractile bodies)、選択封入体として存在しているポリペプチドは、細胞の溶解、封入体を溶解するための凍心と洗滌の繰り返し、例えばグアニジウムSCGによる可溶性、及び再層の折りたたみ、それに続く生物活性分子の精製によって精製できる。

一本鎖の多価抗体の特性は培養中に公知の標準アッセイ、例えば結合アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)及びラジオイムノアッセイ(RIA)により決定できる。

本発明の多価の一本鎖抗体は診断及び治療に利用に固有の利点を提供する。この多価の一本鎖抗体の利用は、大規模のフラグメント又は抗体分子全体の利用に勝る数多くの利点を提供する。それらはその細胞構造により迅速に製造し、そ

して多体からより迅速に排除される。

抗原及び又は治療剤のため、この多価の一本鎖抗体は又は複数の抗体フラグメントが抗原に特異的に結合するように、抗原及び又は複数の抗体フラグメントが抗原もしくは治療因子に対して特異的であるように構築される。

本発明は更に、次の如きの患者の診断及び又は治療において有用な特異的抗体を含む薬製剤も考慮しており、ここでこの特異的抗体はしばしば細胞の膜面上で発現される。抗原及び又は治療剤のため、この多価の一本鎖抗体は適当なイメージ又は治療剤に当業界に公知の方法によって結合される。本発明の薬製剤は適当な当業界に公知の方法、例えば電泳の法、透析又は凍結乾燥工程によって調製される。

本発明を、その単なる例示を認める下記の表裏例の考慮により更に明瞭にする。

#### 略 号

BCP	5-ブロモ-4-クロロ-3-インドールスフェート
bp	塩基対
Bis-Trisプロパン	(1,3-ビス(トリス(ヒドロキシメチル)-メチルアミノ)プロパン)
BSA	牛血清アルブミン
CDE	形質転換受容体
CLISA	酵素結合免疫吸着アッセイ
CV2	お共有一本鎖ダイマー
DEF	毒物局用気体
Dhp	キロ増速剤
LD	Luria Bertani: 培養
Mab	モノクローナル抗体
NES	2-(N-メルカリノ)ニタンスルホン酸
NF	分子重
SDT	ニトロブルーテトラゾリウムクロリド
オリゴ	オリゴヌクレオチド

PAP	ポリアクリルアミドゲル
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PES	リン酸塩緩衝液
PCH	ポリメラーゼ連鎖反応
PGPV	PGPVをコードする DNA配列を含むプラスミド
BTCS	ラジオリンカー
BT	ラジオリンカー
scFv	一本鎖Fvイムノグロブリンフラグメントモノマー
scFv <sub>2</sub>	共有結合した一本鎖Fvイムノグロブリンフラグメントダイマー
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
TDS	トリス緩衝液
トリス	(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン)
TCBS	ツイーン20緩衝液
V <sub>1</sub>	イムノグロブリン重鎖可変ドメイン
V <sub>2</sub>	イムノグロブリン軽鎖可変ドメイン

#### 括 弧

CC49: ヒト腫瘍関連タンパク質72(740-772)に特異的なモノクローナル抗体; ATCC No. HB9459として寄託。

CC19Fab: 電泳のN-末端領域に結合している完全形より成るCC19の抗原結合性領域。

CC49scFv: ペプチドリッガーにより連結されているCC49抗体の二本の可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CC19v2: ダイマーを構成するように非共有結合している2つのCC49scFv。7vの数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えば、CC19v2は六量体の多量体を意味する。

CC49scFv2: 3つのリンカーにより連結されている、2本のCC19v2ドメインと2本のV<sub>2</sub>ドメインとより成る共有結合型一本鎖抗体フラグメント。V<sub>1</sub>(L)とV<sub>2</sub>(H)ドメインとを連結し合わせるのに6つの可能な順序の組合せがある: LRLH, LRLH, LRLH, HLRL, HLRL及びHLLL。

#### プラスミド

PGPV-UDM: 25のアミノ酸リンカーにより連結されている、CC49の可変領域とCC19の重鎖とより成るscFvについてのコード配列を含むプラスミド。

PGPV<sub>2</sub>又はPGPV<sub>2</sub>LB3又はLB3L: 本発明のそれぞれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

#### 表裏例

##### 一般実験

分子クローニングのための手順は、その内容が引用することで本明細書に導入される。 Sambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York第2版(1989)及び Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York(1992)に記載の手順である。

ここで用いた水は全て脱イオン蒸留水とした。

##### オリゴヌクレオチドの合成及び処理

オリゴヌクレオチド(オリゴ)は全て、標準のC-アミノアノメチルホスホリミット及び合成カラムを用い、Applied Biosystems(Foster City, CA)由来のModel 381 BSA合成装置のいずれかで合成した。その生成物上の保護基は、濃水酸化アンモニウムの中で55℃で6~15時間加熱することにより除去した。水酸化アンモニウムはエバポレーションを介して除去し、そしてその乾燥物を30~40μlの蒸留水の中に再溶解させた。ポリアクリルアミド-尿素ゲル上での電気泳動の際、オリゴを濃液(10μl)を用いて可視化させた。DNAバンドをゲルから切り出し、そして1μlの100mMのトリス-HCl, pH 7.4, 800mMのNaCl、5mMのEDTAの中で65℃で2時間かけて溶解させた。最終液量は、DNAをSephacryl S-100カラム(BioLing, Bedford, MA)に適用し、そして結合したオリゴを0.05Mのメタノールで洗脱させることによって行った。その溶液の体積を約50μlに下げ、そしてDNA濃度を200nm(OD<sub>260</sub>)での光学密度を測定することにより決定した。

##### 抗原調製法

抗原調製法は全て、Beitende Research Laboratories(Gaitherburg, MD)。

New England Biolabs, Inc.(Beverly, MA)又はBoehringer Mannheim (DM, fed 1994)から、TBSの調製及び緩衝液を用い、その製造者の推奨する手法に従って実施した。固定させた生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離させた。そのゲルをニチウムブロミドで染色し、そのDNAバンドを塩酸で洗脱により可視化させ、次いでそのDNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5μlのトリス、2.5mMの酢酸、1mMのEDTA, pH 8.0を含む透析チューブ(Electro Dialysis Corp., Chicago)の中に入れた。そしてMax Submarine電気泳動装置(Boehringer Scientific Instruments, CA)を用いて蒸留させた。ランブル容量をSpeed Vac濃縮器(Savant Instruments, Inc., NY)で下げた。DNAをエタノール沈降させ、そして蒸留水の口で再溶解させた。

##### 酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

Johnsonら、Can. Res., 46, 850-857(1986)に従って記載の通りに調製したTAG-72抗原を、ポリビニルクロリド38穴マイクロタイタープレート(Costar Laboratories, Inc., Charlotte, VA)のウェルの上に一度乾燥させることで吸着させた。そのプレートはPBS中の1%のBSAで31℃で1時間ブロックし、次いで200μlのPBS、0.05%のツイーン20で3回洗った。25μlの抗原溶液及び25μlのビオチン化CC49(1/20,000希釈率の10μg/mlの溶液)をウェルに加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。プレートに結合したTAG-72、ビオチン化CC49、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの相対量、及び結合時間、合計は抗体又はビオチン化CC49がないように、しかもscFvによる結合を除去するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5μg/mlのCC49及び10μg/mlのCC49Fabとした。陰性コントロールはPBS中の1%のBSA及び又はDMSOとした。未結合のタンパク質を洗い出した。アルカリホスファターゼの融合された1:1000の希釈率のストレプトアビジン50μl(Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL)を加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。そのプレートを更に3回洗った。50μlのパラニトロフェニルホスフェート溶液(PNPP; Kodaon & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)を加え、そして発色反応を最低20分待たせた。scFv2融合の相対量をマイクロプレートリーダー(Mu-

Secular Devices Corporation, Natick Park, GA) を用い404 ~450 nmでの光密度スキャンにより測定した。scFv2の場合は、免疫の同時低下を示すラジオエチル化試薬の添加の低下をもたらした。

#### SPS-PAGE及びウェスタンブロッディング

SPS-PAGE分析のためのサンプル (20 $\mu$ l) を、泳動用サンプル緩衝液 (Bio-Separal 1 (Integrated Separation Systems (ISS), Hattick, VA) の中で5分間煮沸することにより調製し、そして0.0~20%勾配のポリアクリルアミド (Bio-Rad MiniGel) にその製造者の仕様書 (ISS) に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2-ゲル装置 (ISS) を用い、ゲル当たり55mAで、一定の電流で約75分を行った。ゲルをクマージブリアントブルー-R 25 (Bio-Rad, Richmond, CA) の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子重量標準は予め決められており (Mid Range kit, Diversified Biotech, Newton Center, MA)、そして下記のタンパク質を含んでいた: ホスホリラーゼB、グルタマートデヒドロゲナーゼ、オвалブミン、ラクトアデヒドログナーゼ、尿酸アンヒドラーゼ、ヨーグルトグロブリン及びシクロロムC。対応の分子量はそれぞれ85,000、55,000、43,000、36,000、29,000、18,400及び12,100である。

ウェスタン分析を行うとき、デブリンゲートのゲルも移動した。電気泳動後、ゲルの一方を過塩素酸 (10.3Mのトリス-HCl, pH10.4) の中で15~20分下置にした。Immobilon P 40 (ポリビニルピロリドン) 膜 (Millipore, Bedford, MA) をメタノール中で2分処理し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に陽極緩衝液 (pH 4.0) の中で3分平衡にした。Milliblot-SDE 塗層 (Millipore) を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に転写するために用いた。一面の陽極緩衝液 (pH 4.0) を陽極緩衝液の中央に載せた。Maxam 3M 濾紙のシートを陽極緩衝液 (pH 4.0) の中に浸し、そしてその電極面の上に増幅に直した。陽極緩衝液 (pH 4.0) のトリス、pH10.4) の中に浸した別の濾紙を一枚目の上に載せた。次に溶けたPVP膜を加え、平衡ゲルをその上に置き、そして最後に陽極緩衝液 (pH 4.0) のグリシン中の2%のトリス (pH 4.0) の中に浸した濾紙のシートを貼ることでサンドイッチを作った。転写は250mAの定電流 (初期電圧は8~20ボルト) に適用した) を用いて30分で達成された。

ブロットした後、その膜を水の中で簡単にすすぎ、そして20mlのブロッキング液 (トリス緩衝液 (TBS) の0.1%の牛血清アルブミン (BSA) (Sigma, St. Louis, MO) を含有する皿の中に入れた。TBS は Pierce Chemical (Rockford, IL) より、ナトリウムホスファートとして購入し、500mlの水を加えたとき、その成分物は25mMのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を提供する。これらの膜を最少限1時間は、室温でブロックし、そして20mlづつ0.5%の Tween 20 溶液 (TTBS) を用いて5分間3回洗った。TTBSを調整するには、0.5mlの Tween 50 (5% w/v) を TTBSのリッシャー当たり添加した。使用したブローブ抗体は20mlのビオチニル化 F1D 14抗体とした (10 $\mu$ g/20mlの抗体バッファー)。抗体バッファーは100mlのTTBS当たり1gの BSAを加えることにより作った。室温で30~60分ブローブした後、その後を上記の通りTTBSで3回洗った。

次に、その膜を室温において30~60分、抗原バッファー (pH 7.6) の中で1:500 希釈率のアルカリホスファターゼの染色されたストレプトアビジン (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) 20ml とインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この後繰り返した。発色反応の前に、膜を陽極緩衝液 (pH 4.0) の中で2分洗った。このバッファーは、1Mの炭酸水素ナトリウム、1Mの  $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , pH 8.0 として、アルカリホスファターゼに対する基質を提供するため、ニトロブルー-テトラソリウム (NBT) クロリド (50mg, Sigma) を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かし、6-ブromo-4-クロロ-3-インドイルホスフェート (BCIP) (25mg, Sigma) を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かし、5-ブromo-4-クロロ-3-インドイルホスフェート (BCIP) (25mg, Sigma) を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かし、これらの溶液も、Promegaよりウェスタン発色剤として市販されている。発色のため、それぞれ130 $\mu$ l を上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで発色液からそれらを水で洗い流した。

#### ビオチニル化 F1D 14

F1D 14は、CD49に対して特異的な、ATCC No. CRL10256として寄託されているネズミの膜-イデオタイプ抗体 (IgG<sub>2a</sub>, K $\alpha$ 1ノングリコ) である。F1D 14を Mycote Protein A アフィニティカラム (Yonkers, NY) を用いて精製した。製

血液のプロトコルに従ったが、ただし陽極緩衝液として、0.1Mのクエン酸ナトリウム、pH 2.6を用いた。固相を、0.05Mのトリス-HCl pH 9.0を用いてpH 7に中和した。ビオチニル化反応は下記通りに行われた: F1D 14 (1.0 $\mu$ g、水の中で100 $\mu$ l) を100 $\mu$ lの0.1Mの $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 9.8と混合した。ビオチニル化試薬 (N-エチル-3-(3-ジメチルホルムアミド) カルボジイミド-5-ヒドロキシ-2,2,6,6-テトラメチル-3-ペンタジエン-1-オン) (Pierce & Warriner, Madison, WI) を0.5mlのジメチルホルムアミドの口に加えた。Biotin-X-NHS (20 $\mu$ l) を F1D 14溶液に加え、そして22℃で1時間反応させた。過剰のビオチン及び不純物を、Pharmacia Superose 12 HR10/30カラム (Pharmacia, NJ) を用いてゲル濾過により除去した。0.5 $\mu$ l/minの速度で、ビオチニル化 F1D 14は16.8mlのピークで出現した。このピークを構成する両分をブールし、そして4℃で保存し、そして CD49<sup>+</sup> 及び V $\alpha$ 2 mRNA により決定されるCD49イデオタイプを抽出するのに用いた。

#### 等電点電気泳動 (IEF)

等電点 (pI) は、pHAS-AF (Madison, WI) を介して入手できる PROPSIN-TITRA TR という名のコンピュータープログラムを用いて決定した。入力してある配列による pI の値は、pI に加えて0.05が得られた。Cys残基は電荷に寄与するため、Cysについての計算は (1) に調整し、なぜならそれらは全てジスルフィド結合に関与するからである。

実験的に pI を、IsoGel アゲロース IEF プレート、75cm $\times$ 25cm (Pharmacia Biotech, Rockland, MA) を用いて決定した。Biorad Bio-phoresis 水平電気泳動セルを、IEF を行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、500V (両極)、20mAの電流及び10Wの定電流とした。等電点移動は 90min で完了した。IEF 産物はBioradより購入した。そのゲルはメタノール、ブーラクトグロブリンB、牛血清アルブミン、ヒト尿酸アンヒドラーゼ、馬ミオグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3-リンホスホリルアミノ酸クロームCを含み、それらのpI値は1.65、5.10、6.00、6.50、7.00、7.10及び7.50、7.80、8.00並びに8.20及び8.50である。ゲルを、Pierceにより調製された緩衝液に従って染色及び脱色した。

#### CD49抗体種の定義

16 $\mu$  scFv2の種および単体にFvを含む種 (CD49抗体はすべて、融合している1.3cmの長さの石英製キャベット (Nalco社) および Perkin-Elmer 477/715 分光光度計 (520nm) を用いて、タンパク質濃度の 280nm波長の吸光度を測定して定量した。その吸光度係数 (E<sub>1</sub>) は、各抗体について、下記式を用いて測定した。

$$E_1 = (\text{Trp残基}) \times 5,500 + (\text{Tyr残基}) \times 1,340 - ((\text{Cys})^2 \times 150 - (\text{Pro残基}) \times 10)$$

これらの値は、P. H. Wallauer, Advances in Protein Chemistry, 17巻、375~378 頁に記載されている情報に基づいている。

#### 高性能液体クロマトグラフィー

CD49scFv2を精製するために行った高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、全体にタンニンまたはチフロン膜配管を用いた IEF-EPLC システムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2152型検出器、270nmの吸光度に設定された UV CON 5 II 2228 型検出装置および2211型 (SuperBac fraction collector) で構成されている。

#### サブユニットの分離による型別

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) はすべて、120プログラム (pg) のプラスミド (pSCFV2) ; 100ピコモルのプライマー; 1 $\mu$ l の Perkin-Elmer-Cetus (米国、コネチカット州、ノーウアーク所在の PEG社) の Ampli-Taqポリメラーゼ; 15 $\mu$ l の 10mM dNTP および 10 $\mu$ l の 10 $\times$  反応液 (両者ともに PEG社に提供されている) ; ならびに合計容積を 100 $\mu$ l にするのに充分な水で構成された反応液混合物で行った。PCR反応はメーカーが記載しているのとはほとんど同様に行われた。これらの反応は、PAC 9600型サーモサイクラー (thermocycler) を用いて30サイクルを行ったが、その1サイクルは、94℃で20~45秒間の DNAの変性; 55~60℃で 0.5~1.5分間のアニーリングおよび72℃で 0.5~2.0分間の伸長で構成されている。オリゴヌクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems (米国、カリフォルニア州、ホスター・シティ所在) の383型もしくは581型 DNA合成器で合成し、次いで上記のようにして精製した。

#### リゲーション

100ngのベクター pSL301および対応する11塩基単位の塩基のインサート DNAを用いるリゲーション反応を、Stratagene社（米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在）のT4 DNAリガーキットを用い、該メーカーの指示にしたがって行った。リゲーション反応後（全容積20μL）は最初18℃でインキュベートし、次いで一夜4℃まで徐々に冷却した。

#### 形質転換

形質転換は、100μLのStratagene社の大腸菌（F.co.1）AG1コンピメント細胞（米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在のStratagene社）を用い、メーカーの指示によって行った。上記リゲーション反応後産物のpSL301（〜5μL）を使用した。形質転換ステップの後、細胞は選別可能なリブアブロス（LB）中で37℃で1時間増殖させ、続いて、pSCFV(DM, pSL301もしくはpSL301HIT)を用いる20μg/mLのクロラムフェニコール含有（G418）リブアブロス上にプレートし、またはブラスミドpSL301を含有するクローンもしくはpSL301由来のその他の構築物に用いる100μg/mLアンピシリン（AMP100）リブアブロスプレート（LB+AMP100）上にプレートした。

#### 大腸菌クローンのスクリーニング

細菌ブラスミドは、Promega社（米国、ウィスコンシン州、マディソン所在）のMagileミニプレッププラスミド製造キットを用いて、毎24時間（selection pressure）を維持するため適切な濃度の含有するLBブラスミド培養物から回収した。このキットはメーカーの取扱い説明書にしたがって使用した。

#### ブラスミドの精製

pSL301およびpSL301HITと命名された2種のブラスミドを、多量の一本鎖抗体を製造するために精製した。pSL301HITを含有する菌液は、V<sub>h</sub>-L-V<sub>h</sub>-L-V<sub>h</sub>-L-V<sub>h</sub>で表すことができるオリベプチドを産生した。ここでV<sub>h</sub>とV<sub>l</sub>はCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびリンカー（L）は、下記 SEQ ID NO: 5の配列を有する25個のアミノ酸のリンカーである。

Leu-Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys-Asp-Ala-Ala-Lys Lys Asp-Asp-Alc-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Lys-Asp-Leu

pSL301HITを含有する菌液の精製は、V<sub>h</sub>-L-V<sub>h</sub>-L-V<sub>h</sub>-L-V<sub>h</sub>で表すことができる

示した、陽性プロープであり、かつBamIおよびHaeIによる消化後由来の207塩の塩基対挿入断片（図6に示す558〜765の塩基対（bp）を含有するクローンをpSL301HITと命名し、次いでCC49VHに特異的なヌクレオチド配列を含有するpSL301HITを増殖するのに選択した。HaeI→BamI/penタミヌターをpSL301中に所置した遺伝は、そのHaeIとBamIの部位の間のポリリンカー領域中に存在するEcoRV制限ニードフレアを除去するためであった。このことは、EcoRV制限部位が、構造体中に各塩基V領域を配置するのにユニークである必要があるV<sub>h</sub>とV<sub>l</sub>の領域を併せて製造するため設計された。各V領域がCC49V HaeI部位に付加されると、EcoRVはもはや存在しないため、ユニーク挿入断片に入ってくる次のEcoRV部位を形成した。

V<sub>h</sub>配列は、F66塩基の終端としてpSCFV 3'末端を用い、オリゴの5'端と5'オリゴSCPSによってF66で付着した。SCPIに対するDNA配列（SEQ ID NO: 10）とSCPSに対するBNA配列（SEQ ID NO: 11）は次のとおりである。

SCP1: 5'-TAAA CTC GAG GTT CAG TTG CAG CAG-3'

SCP5: 5'-TAAA GGT AGC AGC AGC GGT TAA TGA TGA GAC GGT CAG GGT-3'

下線を付けた部分はエンドヌクレオチド制限部位を示す。

増幅されたV<sub>h</sub> DNAを、4%のTAC、電気泳動、エタノールによる沈殿および50μL水への溶解によって増幅した。そのV<sub>h</sub>配列をHaeIとHaeIの塩基酵素で消化し、同じ制限酵素で消化されたHaeIで増幅されたpSL301HITベクターに対するインサートとして用いた。標準のリゲーション反応を行い、次いで一晩4℃でインキュベートしてコンピメント大腸菌AG1細胞に形質転換させた。形質転換された細胞を、LB AMP100滅菌プレート上にプレートした。CC49Vインサートを含有していることを示す構築物クローンをHaeIおよびHaeI消化スクリーニングから検出した。

United States Biochemical（USB）社（米国、オハイオ州クリーブランド所在）のSequencing Kit、および配列決定用プライマーpSL301SE08（pSL301ベクター中、HaeI部位から57bp）上流においてアメルした21bpの配列決定プライマー）とCC49VHを用いて、HaeIの配列決定を行って、（CC49Vの配列を導出し、pSL301HIT中に正しいCC49V配列を有するクローンを明らかにした。このブラスミドは

オリベプチドを産生した。ここでV<sub>h</sub>とV<sub>l</sub>はCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびHaeIは上記アミノ酸配列を有するベプチドリンカーである。

CC49V: L-V<sub>h</sub>-L-V<sub>h</sub>-L-V<sub>h</sub> (pSL301HIT) のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 6）とアミノ酸配列（SEQ ID NO: 7）を図6に示す。（CC49V: L-V<sub>h</sub>-L-V<sub>h</sub>-L-V<sub>h</sub> (pSL301HIT)のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 8）およびアミノ酸配列（SEQ ID NO: 9）を図7に示す。

#### pSL301HITの構築

pSL301HITの構築を図8に示す。バシラス・リヘニフォルミス（*Bacillus licheniformis*）のペニシリンナーゼP（penP）ターミナーターの配列を、HaeIおよびBamIで45分間消化することによって、pSCFV(DM)に付着させたブラスミドから取出し、電気泳動を行った後、4.5%オリブアクリルアミドゲルから切り取り、電気泳動させ、エタノールで沈殿させ、次に、同様に製造されたベクター：pSL301（米国、カリフォルニア州、サンディエゴ所在のInvitrogen社）中の同じ部位に挿入した。pSCFV 3'末端の製造手順は、1992年8月21日付け出願の米国特許第5,793,675号に記載されている。なおこの出願の開示事項は本開明に適用するものである。次に、pSCFV 3'末端は、penPプロモーターのヌクレオチド配列；図9 HaeI制限部位；CC49V領域；BamI制限部位；25個のアミノ酸のリンカー；図9 HaeI制限部位；（CC49V領域）；HaeI制限部位；penPターミナーター；およびBamI制限部位を含有している（図8参照）。このpenPプロモーターとpenPターミナーターは、Herscovitch, L. Biol. Chem., 258巻, 11211〜11215頁, 1983年に記載されている。

上記のリゲーション反応物の一部（3μL）を、LB+AMP100滅菌プレート上にプレートし、次いで一晩増殖させたコンピメント大腸菌AG1細胞を形質転換するのに用いた。penPターミナーター、インサートを含有するポテンシャルクローンを、Pharmacia社（米国、マリランド州、ガイサーズバーグ所在）の77 Quickspin<sup>TM</sup> DNA高速回転機と、Biochemicals社、Nucleic Acid Research, 17巻, 452頁, 1989年に記載されているマイクロ遠心によるコロニー溶解法をともに用いてスクリーニングした。ブラスミドは、penP-HaeI-BamIターミナーターフラグメント自体であるが、Quickspinキットによって提供された指示によって製造した

pSL301-HITおよびpSL301-HITの両方を増殖するときの出発点で使用した。使用した配列決定用のオリゴをここに示す。

pSL301SEQ8 (SEQ ID NO: 12) および CC49V: (SEQ ID NO: 13) のオリゴヌクレオチド配列は次のとおりである。

pSL301SEQ8: 5'-TCG TCG GAT TAC GCA AGC TTA 3'

CC49VBP: 5'-GAT GAT TTT AAA TAC AAT TAG 3'

#### 表6 例1 pSL301HITの構築

pSL301HIT（5μg）を出発物質として用い、これをEcoRVHaeIおよびHaeIで消化し、大きい方のベクターフラグメントを精製した。CC49VH挿入フラグメントは、5'オリゴとしてSCPSを付くオリゴとしてSCPSを用い、PCRによって製造した。SCPSのヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 14）は下記のとおりである。

SCP5B: 5'-TAAA TCC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA CCA AAA GAC GAT GAC AAA AAG GAT GAC GGC AAG AAA GAT GTT GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT-3'

またオリゴ SCP5Bはリンカーのコーディング領域の一部（SEQ ID NO: 14のbp 8〜76）を含有している。pSCFV 3'末端のCC49V領域でアメルするよう設計されたオリゴの部分は、SEQ ID NO: 14中のbp 77〜90由来のものである。

下線を付けた配列はTspI部位に相当する。得られたPCRインサートを増幅し、TspIとHaeIで消化し、次いでpSL301HIT EcoRVHaeIベクターとのリゲーション反応に用いた（図7）。コンピメント大腸菌AG1細胞を、このリゲーション反応物（3μL）で形質転換を行うのに用い、LB+AMP100滅菌プレート上にプレートした。pSL301HIT生成物を示す正しい大きさのHaeI-HaeIインサートを有する2個のクローンの配列をオリゴ3'末端を用いて決定し、正しい配列（図7のヌクレオチド1124〜1543）を有する単クローンをその後の構築に用いるのに導出した。SCP1のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 15）は下記のとおりである。

SCP1: 5'-TGA ACT TTA TGT AAG ATG ATG T-3'

最終のリンカーV<sub>h</sub>サブユニット（bp 1544〜1553、図7）は、5'オリゴの8 CPTと3'オリゴのSCPSを用いたPCRの標的としてpSCFV 3'末端を用いて製造

した。SCP7bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 16)は下記のとおりである。

SCP7b: 5'-TAA TGC GCA GAT GAC GAG AAA GCA GCA GCT AAA AAA GAG GAT  
GCG AAA ANG GAT GAC GCG AAA AAA GAT CTT GTC ATG TCA CAG TTT  
CC

下線をつけたヌクレオチドは PstI 部位である。SCP8aのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 17)は下記のとおりである。

SCP8a: 5'-TAA GCT AAG TTT TTA CTT AAG CAC  
CAG CTT GGT GCG-3'

下線をつけた最初の二塩は XbaI 部位に相当し、もう一つの塩は AflII 部位に相当する。SCP7bのヌクレオチド8〜70はリンカーをコードし(図7のヌクレオチド1344〜1612)、一方V<sub>1</sub>にアミノ化するヌクレオチド77〜93は図7の1012〜1635に相当する。プライマー SCP8aは、その3'末端の近いチール、NheI 制限部位、終止コドン、AflII 制限部位およびV<sub>1</sub>の最後の2塩基を含むしている。EspI と NheI による消化の後、この得られた 42bp のインサートを精製して精製pSL301HTベクターの NheI と Eco47III 部位に導入し、候補的なクロノンを NheI と XbaI でスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されかつpSL301 (−) とSCP7で配列が決定されて、pSL301HT中に新たに導入された配列が確認された。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 18)は下記のとおりである。

481F32 (−): 5'-CTG CTG GTA CCA GCG CAA G-3'

プラスミドpSL301HTを XbaI および NheI で消化し、精製し、得られた1176 bpのリンカー-V<sub>1</sub>リンカー-V<sub>1</sub>セグメントを pSCFV URMに連結して p49LHLHを構築した。なおこの pSCFV URMは同じ制限酵素で切断される大きい方のフラグメントを精製したものである。そのリブライゼン反応生成物(1μl 経分)を用いてコンピレント大腸菌AG1細胞(Stratagene社)を形質転換し、LB/CA/2% 寒天プレートにプレートした。正しい制限酵素型を有するプラスミドを含むスクローンを、p49LHLHを含むさせるために選択した。p49LHLHは、6C49 多量一本鎖抗体 scFv2: V<sub>H</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>H</sub>。またはCC49scFv2 (LHLH)のpenP プロモーターとヌクレオチド配列を含むしている。

これは次のステップで修正され、オリゴSCP6C (SEQ ID NO: 21)の末端に5塩基の欠失を補正することによってpSL301HTを調製した。

SCP6C: 5'-TAA GCG CTATGATGCTTAAAGAGGAGCCGCAAAAA  
CCAGCAACGCAAAAAAGATGATGCGCAAAAGAGCTCTCG  
AGCTCTATGTCAGGACTCTGAC-3'

SCP6C中の下線をつけた配列はEco47III部位に相当する。PCRにおいて、SCP6Cは5'オリゴとして用いられ一方SCP16123'オリゴとして用いられ、リンカー-CC49V<sub>1</sub>セグメントが生成する。SCP10のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 22)は「正」とおりである。

SCP10: 5'-TAT TGC TAG CTT TTT ATG AGG AGA GCG TGA  
GTC AGG TT 3'

SCP10中の下線をつけた配列は図6のヌクレオチド1958〜1963に見られる XbaI 部位に相当する。この場合、PCRインサートは NheI だけで消化されたいで精製される。ベクター(pSL301HT)はEco47III部位(先に形成されている)および NheI 部位で消化されたいで精製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(3 μl)を用いてコンピレント E. coli AG1細胞を形質転換した。この形質転換細胞をLB-AMP100プレート上にプレートし、次いで候補的なクロノンを XbaI と NheI でスクリーニングした。正しい大きさの DNAを有する3個のクロノンを得た。これらのクロノンのうちの2個は、オリゴ49HCDR3 (−) およびSCP1を用いて配列を決定した。そのヌクレオチド配列(49HCDR3 (−) の SEQ ID NO: 23)は下記のとおりである。

49HCDR3 (−): 5'-GAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクロノンが得られ、そして図6のヌクレオチド1953〜1963からの配列が確認され、正しいpSL301HTクロノンを示した。

大腸菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミド p49LHLHを製造するために、pSL301HT (5 μg)を NheI と XbaI で消化し、次いで V<sub>H</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>H</sub>配列を含む小さい方のインサートを精製した。この断片を、pSCFV URM (5 μg)を XbaI と NheI で消化して得た大きい方のベクターフラグメントの精製物と連結した。上記連結混合物の一部(4 μl)を用いてコンピレント大腸菌AG1

## 実施例2: p49LHLHの構築

p49LHLHの構築を図10に図式的に示す。リンカー-V<sub>1</sub>のサブユニットを5'オリゴの SCP7bと3'オリゴのSCP9で製造した。

SCP9: 5'-TAA AAG TAG CAG CAA GCG CTT AGT TTC  
AGC AGC AGC TTC GTC CCA G-3'

SCP7bオリゴ(ヌクレオチド8〜70)は図6のリンカーをコードし(ヌクレオチド1124〜1192に相当する)および図6のV<sub>1</sub>のヌクレオチド1193〜1215に相当する。PCRに對する pSCFV URM用の(ヌクレオチド77〜93)にアミノ化した。

SCP9は、XbaI 部位(第一の下線をつけたヌクレオチド)と Eco47III 部位(第二の下線をつけたヌクレオチド)を有し、これらの部位は次のV領域を受けるための pSL301HTを作るのに必要な制限部位である。SCP9のヌクレオチド18〜23は図6のヌクレオチド1532〜1537(リンカーの最初の2個のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方ヌクレオチド24〜45は、PCRにおけるSCP5 (SEQ ID NO: 19)のアミノ酸リンゲル領域である図6に示すヌクレオチド1508〜1531に相当する。プラスミドpSL301HTを Eco47III と NheI で消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、予め EspI と NheI で切断され精製された、PCRからのリンカー-CC49V<sub>1</sub> DNA インサートと連結させる。その連結混合物(3 μl)を用いて大腸菌AG1コンピレント細胞を形質転換し、次いで正しい XbaI - NheI の大きさのフラグメントを有する一つのコロニーの配列をオリゴ 49HCDR3を用いて決定した。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 20)は下記のとおりである。

5' TTG ATC ACC AAG TGA CTT TAT G-3'

配列決定の結果は、得られたpSL301HTクロノン中に PCRの誤りや欠失があるということを示した。図8にみられるヌクレオチド1533〜1537に相当する5塩基の塩基の欠失がみとめられ、そして丁であるべきはずのヌクレオチド1531は DNA配列のデータから確認したところ実際にはGであった。得られた配列は、

5'-CAAGCGCTT...であった。

こゝで下線をつけた配列は偶然に Eco47III 部位を形成した。図8のAGCGCTの配列はヌクレオチド1530、1531、1532、1538、1539および1540に相当する。この主要

塩基を形質転換した。得られた形質転換細胞をLB-CA/2% プレート上にプレートし、次いで p49LHLHに對する代表的なクロノンを、正しい制限酵素型(図10参照)および TAG T2に對する生物活性に基づいて選択した。

## 実施例3: CC49 scFv2のLHLHとLHLHが共有結合した二量体の精製

CC49の共有結合した一本鎖二量体(scFv2)の精製を行うために、大腸菌のペリプラスマ膜造りの成分を、p49LHLHと p49LHLHの両方の 1.2 Lの一液培養物から調製した。集約すると、培養物を 250 ml づつの4部分に分類し、Sorvall GS-5 ロータで10分間 5300rpmで遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、300 μl HClを含む30 μl トリス-HCl pH 7.3からなる 100 μl 中に再懸濁させた。細胞を再びペレット化し、合計 100 μl の30 μl トリス-HCl pH 7.3で洗浄し、そして一つのチューブにプールした。このチューブに、40 μl/V<sub>1</sub>のスクロースを含む30 μl トリス-HCl pH 7.3(100 μl) および16 μl E9TA pH 7.5(2.0 μl) を添加した。得られた混合物を、時々攪拌しながら、室温に10分間保持した。高張性細胞(lytotoxic cell)を確認するようにしてペレット化した。次のステップでショックを与えて、該ペレットを20 ml の水(0.5 M HCl)中に適やかに懸濁させ、次いで時々攪拌しながら水上に10分間保持した。その細胞を静置するようにしてペレット化し、大腸菌の周辺細胞質の成分を含む上澄み液を、0.2 μm の Nalgene (米国、ニューヨーク州、ロチェスター所在)の透過膜を通してることによってさらに清澄にし、次いでAmicon社(米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在)のCentricon 30およびCentricon 30で 1.0 ml より小さい容積まで濃縮した。

p49LHLHまたは p49LHLHのクロノン由来の遊離周辺細胞質のシグナール (choc kete) を、Pharmacia社(米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ所在)のSuperdex 75 HZ 10/30 BF16 カラム(予め PBSで平衡化させたもの)に注入した。競合 ELISAに測定する場合、問題の生成物は 0.5 ml/分の流量で2〜24分間流出させた。活性成分をプールし、先に述べたようにして凍結し、次に、システム500 Microdialyzer Unit(Pierce & Warriner社)を用い、緩衝液を3〜4回変更しながら3000カutoff膜を使用して、20 μl トリス-HCl pH 7.6に次いで一液凍結を行った。その試料を Pharmacia社のHPLC 2 HPLC 5 アニオン交換HPLCカラムに注射した。緩衝液入として20 μl トリス-HCl pH 7.6を用い、吸光度Dとし



て20Mトリス-HCl pH 7.8に0.5M NaCl を含いる緩衝プログラムを、1.5ml/min の流量で使用した。同様の生成物は、緩衝液1Lに15%の割合で添加する場合、各々3〜4分間から放出された。この時点の両方の、二つの SDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクローマシーブリアントブルー3230で染色し、他方のゲルはウエスタン分析（ブローブ抗体としてジオチニル化 PAID 14を使用）に移されたが、scFv2(LH2)またはLH2Lの種の計算分子量の単一バンドが、55,239ダルトンの位置に出現した。活性成分は単離後、50mM NaCl pH 5.8に対して一歩透析し、次いで Pharmacia社のMono S HR 5/5カチオン交換カラムに注射した。この体積メソッドからの抽出の二つの百分の五は、SDS-PAGE および ELISA法で測定する場合、均一性の使用が開始される直前に放出された。したがってこれらの百分は両方ともカラムに結合していなかったわけである。次いで百分五と五はさらに同型するためにプールした。

Mono Qカラムを活性Xtrao S成分について両方使用したが使用した緩衝液は20mM トリス-HCl pH 8.0であり、流量は 0.2ml/minに低下させた。生成物からカラムとの結合なしで放出されたが、Mono Sに吸着している生成物がわずかにあり、したがって分離は5〜6分間かかった。この結果を行った後、生成物は再分析であり以後の特性決定のために貯蔵した。

#### 等電点電気泳動

生成物の等電点 (pI) は DEXTRA社（米国、ワシントン州、マディソン所在地）のコンピュータプログラム Protein-litrateを使用して予測した。アミノ酸組成、およびpI値に基づいて計算した。

試験では、pIは、PNC Bioproducts社（米国、メーン州、ロックランド所在地）のIsmael IEPプレート（60mm）を使用して測定した。上記 IEPを操作するために、Biorad社（米国、カリフォルニア州、リッチモンド所在地）の電気泳動装置を、上記両メーカーの指示にしたがって使用した。その標準電圧の範囲は、70mAで500V（設定）および一定電流の10Wであった。等電点電気泳動は30分間で完了した。Biorad社の IEP装置は、フィコシアニン、シラクトグロブリンB、ウシカルボニックアンヒドラーゼ、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ、ウミイカグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のヒラメタンタンパク質およびシトクロム

Cの含有され、pI値はそれぞれ4.55、5.13、6.49、6.59、7.00、7.50、7.8、8.0、9.20 および 9.6であった。ゲルは PNCの指示にしたがって染色し乾燥した。DEXTRA プログラムによって両方の scFv2の種のpIとして 9.1の値が予測された。純品の生成物に対して単一の明確なバンドがゲル上に、両者のpI値の 0.5の位置にみとめられた。

IgG、scFv2 (LH2およびLH2L) のような複雑な構造は、280nm波長の紫外線を分光学的に測定することによって定量化した。紫外線吸収係数は、各々、先に引用した Bradfordの式を用いて測定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、CC49IgG、CC49scFv2(LH2)、CC49 scFv2(LH2L)およびCC49scFv2のpI値 (280nm)値はそれぞれ 1.43、1.85、1.85 および1.91であった。

#### 実験例4

CC49scFv2の種のLH2とLH2Lの相対割合を、IgGおよびCC49抗体にELISAペプチドを有する単離scFv2と比較した。

パーセント結合 (percent competition) を下記式によって ELISAのデータから求めた。

$$\text{ゼロ結合} = \frac{\text{試験品取り値 (OD 405-450nm)}}{\text{ゼロ結合 - 100\%結合}} \times 100$$

“ゼロ結合 (zero competition)” 値は、1% BSAをジオチニル化CC49 (3×10<sup>-14</sup>モル) と1:1比率で混合して測定し、一方 100%結合はジオチニル化 CC49IgGと混合した CC49IgGの5 μg/ml試料に基づいた値である。これらのデータは図11に示す。試料の吸光度値は (OD<sub>405-450nm</sub>) で測定した。3つの吸光度値の平均値を使用した。最初に試料 (25 μl) を、TAG-72でコートしたマイクロリッセルプレートに、1.0×10<sup>-10</sup> モルの結合部位/μLで塗布した。ジオチニル化CC49 (4 μg/μl 1:20,000に希釈、25 μl 使用) で試料を1/2濃度で希釈した。反応を停止 (1:2) を行った。両方の形態の scFv2は IgGには同等しい (図11参照)。別の試験で、CC49scFv2を単離した scFv2と比較した。両者は一様であるが、これらは TAG-72に対する結合アフィニティが等しいことを示した。これらの結果は、共有結合の二重体の両者の形態は、二つの充分に

機能的な抗原結合部位を有していることを示している。これは、単量体の二に比べて全 IgGについてみられるのと同等結合力の増大である。

またこれらのデータは、scFv2分子が、その CC49IgGの二と四重に、免疫反応性増進の機構であり、毛細血管透過性の増大および一層浸透性生体分布薬物輸送の利点を有することを示している。この利点によって、既知の IgG分子に比べて、本発明の化合物は多数回注射することができ、かつ副作用に用いる免疫療法において副作用：組織損傷を減らすことができる。

本発明の他の実施形態は、本明細書を検討するかまたは本願に開示されている発明を実施することから、当該技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施例は例示だけを目的とするもので、本発明の真の範囲と形態は以下の請求の範囲によって示される。

以 上

#### 請求の範囲

1. 2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する特異性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーを介して共有結合されており、この第一のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Arg Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Leu Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu

を有し、

そして各フラグメントは:

- (a) 経膜可変ドメインを含んで成る第一ペプチド;
- (b) 連続可変ドメインを含んで成る第二ペプチド; 及び
- (c) この第一と第二のペプチドを機能的な結合部位へと連結させる

第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、多価の一本鎖抗体。

2. 前記抗体可変領域が下記の配列

Asp Ile Val Met Ser Cln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Cln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Cln Cln Lys Pro Gly Cln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Thr Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Cln Cln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys

と実質的に同じアミノ酸配列を有しており、そして前記抗体可変領域が下記の配列

Glu Val Cln Leu Cln Cln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Cln Asn Pro Glu Cln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr

Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Ser Thr Ala Asp Lys Ser  
Ser Ser Thr Ala Tyr Val Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp  
Gly Glu Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

と実質的に同じアミノ酸配列を示している。請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

3. 前記第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

4. 多価の一本鎖抗体をコードする DNA配列であって、この多価の一本鎖抗体が2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカーを介して共有結合されておる、そして各フラグメントは：

- (a) 抗原可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連絡せしめる

第二のペプチドリンカー；

を含んで成る、DNA配列。

5. 前記第一ポリペプチドをコードする配列が下記の配列：

GAC ATT CTC ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA  
GTC GCC GAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC AGT CAG AGC  
CTT TCA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TCG TAC  
CAC CAG AAA CCA GGG CAG TCT GCT AAA CTG CTG ATT TAC TTG  
GCA TCC GCT AGC CAA TCT CGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC  
AGT GGA TCT CGC ACA CAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG  
AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT  
AGC TAT CCC CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTG  
AAG

と実質的に同じであり、そして前記第二ポリペプチドをコードする配列が下記の配列：

CAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GGT GAG TTG GTG AAA CCT  
GGG GGT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC  
TTG ACT GAC CAT GCA ATT CAC TCG GTG AAA CAG AAG CTT GAA  
CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT  
CAT TTT AAA TAC AAT CAG AGC TTC AAG CCC AAG GGC ACA CTG  
ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT CGC TAC GTG CAG CTC AAC  
AGC CTG ACA TCT CAG GAT TCT GCA CTG TAT TTC TCT ACA ACA  
TCC CTG AAT ATG GGC TAC TCG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC  
GTC TCC TCA

と実質的に同じである、請求項4記載の DNA配列。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**